

**Einfluss moderner Konservierungslösungen auf den Ischämie- und  
Reperfusionsschaden im Rahmen der experimentellen  
Lungentransplantation am Großtiermodell**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Felix Pfeifer**

**geboren am 18.02.1977 in Karlsruhe**

**Gutachter:**

**1. PD Dr. Wittwer**

**2. PD Dr. Sakka**

**3. Prof. Dr. Reichensperner**

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

**04.10.2005**

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A.</b>	Arteria
<b>AF</b>	Atemfrequenz
<b>AMV</b>	Atemminutenvolumen
<b>ARDS</b>	Acute Respiratory Distress Syndrome
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>C</b>	Dynamische Compliance
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>CD</b>	Leukozytenantigene
<b>CF</b>	Mukoviszidose (Cystic Fibrosis)
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>COPD</b>	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
<b>D</b>	Dalton
<b>EC</b>	Euro-Collins
<b>ET-1</b>	Endothelin-1
<b>et al.</b>	et alii
<b>Fe</b>	Eisen
<b>F<sub>i</sub>O<sub>2</sub></b>	inspiratorische Sauerstofffraktion
<b>GTP</b>	Guanosinmonophosphat
<b>HF</b>	Herzfrequenz
<b>HZV</b>	Herzzeitvolumen
<b>I.E.</b>	Internationale Einheiten
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IPF</b>	idiopathische pulmonale Fibrose
<b>IRS</b>	Ischämie-Reperfusionsschaden
<b>ISHLT</b>	International Society for Heart and Lung Transplantation
<b>Ka<sup>+</sup></b>	Kalium
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>LA</b>	linkes Atrium
<b>LPD</b>	low-potassium-dextran
<b>MAP</b>	mittlerer arterieller Blutdruck
<b>MDA</b>	Malondialdehyd
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>NADPH</b>	Nicotinamidadenindinucleotid
<b>NIH</b>	National Institute of Health
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>PAF</b>	platelet activating factor
<b>PAP</b>	Pulmonalarteriendruck
<b>PCWP</b>	pulmonalkapillärer Verschlussdruck
<b>PEEP</b>	positiver endexpiratorischer Druck
<b>PG</b>	Prostaglandin
<b>PIP</b>	inspiratorischer Spitzendruck (Peak Inspiratory Pressure)
<b>PMN</b>	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
<b>p<sub>a</sub>O<sub>2</sub></b>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
<b>PVR</b>	pulmonalvaskulärer Widerstand

<b>s.</b>	siehe
<b>SVR</b>	systemvaskulärer Widerstand
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TV</b>	Tidalvolumen
<b>UW</b>	University of Wisconsin
<b>V.</b>	Vena
<b>W/D-Ratio</b>	Wet/Dry-Ratio
<b>ZVD</b>	zentraler Venendruck

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
2.1 Aktuelle Problematik der Lungentransplantation .....	10
2.2 Historische Entwicklung der klinischen Lungentransplantation.....	12
2.3 Struktur und Funktion der Lunge .....	13
2.4 Ischämie- und Reperfusionsschaden .....	17
2.4.1 Einfluss des Organspenders .....	17
2.4.2 Einfluss der kalten Organischämie.....	18
2.4.2.1 <i>Oxidativer Stress</i> .....	18
2.4.2.2 <i>Inaktivierung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase</i> .....	20
2.4.2.3 <i>Einfluss der intrazellulären Kalziumkonzentration</i> .....	20
2.4.2.4 <i>Freisetzung von Eisen</i> .....	21
2.4.3 Folgen der Organreperfusion .....	21
2.4.3.1 <i>Zellmembranmoleküle</i> .....	21
2.4.3.2 <i>Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren</i> .....	22
2.4.3.3 <i>Leukozytenfunktion</i> .....	23
2.5 Prinzipien der Lungenkonservierung .....	24
2.5.1 Konservierungslösungen.....	24
2.5.2 Physikalische und chemische Beeinflussung .....	28
2.5.2.1 <i>Hypothermie</i> .....	28
2.5.2.2 <i>pH-Wert</i> .....	29
2.5.2.3 <i>Perfusionsdruck</i> .....	29
2.5.2.4 <i>Inflationszustand der Lunge</i> .....	29
2.5.2.5 <i>Oxygenierung des Beatmungsgases</i> .....	30
2.6 Methoden der klinischen Lungenkonservierung .....	30
2.7 Experimentelle Modelle .....	32
2.7.1 In-vitro Modelle.....	32
2.7.2 Ex-vivo Modelle.....	32
2.7.3 In-vivo Modelle .....	33
2.7.4 Großtiermodelle .....	33
2.8 Ziele der Arbeit .....	34
<b>3. MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>35</b>
3.1 Versuchstiere.....	35
3.2 Versuchsgruppen .....	36
3.3 Versuchsdurchführung.....	36

3.3.1 Anästhesie .....	36
3.3.2 Operatives Vorgehen .....	37
3.3.2.1 Präparation des Spendertiers .....	37
3.3.2.2 Empfängeroperation .....	38
3.3.2.3 Präparation des Organpaketes .....	39
3.3.2.4 Implantation der Lunge .....	40
3.3.5 Funktionelle Parameter .....	41
3.3.5.1 Spendertier .....	41
3.3.5.2 Empfängertier .....	42
3.3.6 Serologische Parameter .....	42
3.3.6.1 Malondialdehyd .....	43
3.3.6.2 Endothelin-1 .....	43
3.3.7 Morphologische Parameter .....	44
3.4 Statistische Methodik .....	45
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
4.1 Spendertiere .....	46
4.1.2 Körpergewicht .....	46
4.1.3 Hämodynamische Parameter .....	46
4.2 Flushdruck .....	48
4.3 Flushzeit .....	49
4.4 Kalte Ischämie- und Transplantationszeit .....	50
4.5 Empfängertier .....	50
4.5.1 Mortalität .....	50
4.5.2 Körpergewicht .....	51
4.5.3 Pulmonalvaskulärer Widerstand .....	51
4.5.4 Dynamische Compliance .....	53
4.5.5 $p_aO_2/F_iO_2$ -Quotient .....	55
4.6 Wet/Dry-Ratio .....	57
4.7 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten pro Alveolus .....	58
4.8 Malondialdehydkonzentration .....	59
4.9 Endothelin-1-Konzentration .....	61
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
5.1 Diskussion der angewandten Methodik .....	64
5.1.1 Tiermodell .....	64
5.1.2 Standardbedingungen .....	65
5.1.3 Versuchsparameter .....	66
5.2 Diskussion der Ergebnisse .....	68
5.2.1 Ergebnisse der Spendertiere .....	68

5.2.2 Ergebnisse der Empfängertiere .....	68
5.2.3 Beurteilung der Konservierungslösungen .....	71
5.4 Schlussfolgerung .....	73
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>74</b>
<b>7. VERZEICHNISSE.....</b>	<b>88</b>
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	88
7.2 Tabellenverzeichnis .....	89
<b>8. ANHANG.....</b>	<b>90</b>
8.1 Lebenslauf .....	90
8.2 Ehrenwörtliche Erklärung.....	91
8.3 Danksagung .....	92

# 1. Zusammenfassung

## *Einleitung*

In den letzten Jahren hat sich die Lungentransplantation zur Therapieform der Wahl für Patienten mit Lungenerkrankungen im Terminalstadium entwickelt. Trotz des Erfolges trägt besonders die Ausbildung des Ischämie-Reperfusionsschadens zum postoperativen Transplantatversagen und zu einer limitierten Überlebensrate der transplantierten Patienten bei. Die Euro-Collins-Lösung [EC] stellte viele Jahre den internationalen Standard der klinischen Lungenkonservierung dar. Die Konservierung mit der kaliumreichen EC-Lösung wird hinsichtlich des Ischämie-Reperfusionsschadens und einer relativ kurzen Ischämietoleranz von ca. 6-8 Stunden als suboptimal erachtet. Um die Lagerungsfähigkeit des explantierten Organs zu verlängern und die Entwicklung eines Ischämie-Reperfusionsschadens weitgehend zu verhindern, wurden kaliumarme extrazelluläre Lösungen entwickelt. Hauptvertreter der modernen extrazellulären Lösungen sind Perfadex und Celsior.

## *Material und Methodik*

Unter Verwendung eines *in-vivo* Transplantationsmodells am Schwein [n=5/Gruppe] wurden die Konservierungslösungen Perfadex und Celsior miteinander verglichen. Nach einer kalten Ischämiezeit von ca. 27 Stunden wurden über den gesamten Versuchszeitraum, einschließlich sechsstündiger Nachbeobachtungsphase, funktionelle und serologische Parameter zur Beurteilung der Transplantatfunktion erhoben. Am Versuchsende wurden Gewebeproben zur histologischen Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens und zur Bestimmung des intrapulmonalen Wassergehalts entnommen. Beide Versuchsgruppen wurden mit einer Kontrollgruppe „sham-operierter“ Tiere verglichen.

## *Ergebnisse*

Alle Tiere der Celsior-Gruppe verstarben nach  $58 \pm 47$  Minuten am Rechterzversagen. Die Werte für die Gasaustauschfunktion, Endothelin-1 sowie den intrapulmonalen Wassergehalt zeigten in der Celsior-Gruppe die schlechtesten Ergebnisse. Die Perfadex-Gruppe wies über den gesamten Versuchsablauf konstant bessere Werte aller funktionellen und serologischen Parameter verglichen mit der



Celsior-Gruppe auf. Dennoch ergaben sich signifikante Unterschiede zur Sham-Kontrollgruppe.

### *Schlussfolgerung*

Es konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung der Perfadex-Lösung die Ischämietoleranz der Lunge wesentlich gesteigert wurde. Im Unterschied zur Celsior-Gruppe wurde somit das frühe Auftreten eines schweren Ischämie-Reperfusionsschadens verhindert. Dies resultierte in einer deutlich geringeren Organschädigung der Lunge bei Verwendung der Perfadex-Lösung im Vergleich zur Celsior-Lösung. Alle Tiere der Celsior-Gruppe sind infolge des Ischämie-Reperfusionsschadens zu einem frühen Versuchszeitpunkt gestorben. Dies unterstreicht die Überlegenheit von Perfadex als Konservierungslösung auf dem Gebiet der Lungentransplantation. Besonders der Dextrananteil der Perfadex-Lösung scheint über mehrere Mechanismen in diesem Modell Aufbau für die bessere Transplantatfunktion verantwortlich zu sein.

Die Ergebnisse der vorgelegten Studie sprechen für eine zuverlässige klinische Anwendung von Perfadex mit möglicher Verlängerung der Ischämiezeiten deutlich über die üblichen 6-8 Stunden hinaus.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Aktuelle Problematik der Lungentransplantation**

In den letzten 20 Jahren entwickelte sich die Lungentransplantation von einem experimentellen Stadium zur Therapie der Wahl für Lungenerkrankungen im Terminalstadium. Gegenwärtig sind weltweit mehr als 14000 Lungentransplantationen durchgeführt worden, dabei beläuft sich die jährliche Anzahl auf ca. 1500 Transplantationen (Hertz et al., 2002). Zu den führenden Indikationen zählen die chronisch obstruktive Lungenerkrankung [39 %], die idiopathische pulmonale Fibrose [16,9 %], die Mukoviszidose [16,1 %] sowie die primäre pulmonale Hypertonie [4,6 %] und das Alpha-1-Antitrypsinmangel-Emphysem [9,3 %] (1986; McLaughlin & Rich, 1998; Meyers & Patterson, 1999; Huddleston & Mendeloff, 2000; Hertz et al., 2002).

Grundlage für die klinische Etablierung der Lungentransplantation bilden die Fortschritte in der Entwicklung neuer Konservierungsverfahren, verbesserte Operationstechniken insbesondere der Gefäß- und Bronchusanastomosierung, und die Einführung der Immunsuppression zur Verminderung der immunbedingten Transplantatabstoßung.

Trotz dieser Erfolge konnte die 1- bzw. 5-Jahresüberlebensrate von 75 % bzw. 50 % seit 1991 nicht wesentlich gesteigert werden (Hertz et al., 2002).

Die Probleme einer erfolgreichen klinischen Anwendung der Lungentransplantation lassen sich in vier Felder unterteilen, welche die größten Herausforderungen für den weiteren Fortschritt in der klinischen Lungentransplantation darstellen (Stewart & Patterson, 2001):

1. Mangel an geeigneten Spenderlungen
2. Ischämie-Reperfusionsschaden
3. Akute Transplantatabstoßung
4. Chronische Transplantatabstoßung – Bronchiolitis obliterans

### *Mangel an Spenderorganen*

Mit einer Verlängerung der Ischämiezeit des Transplantats, die heute bei 6-8 Stunden liegt, ließe sich der Einzugsradius von potenziellen Spenderlungen vergrößern und somit der Mangel an Organen verringern (Grover et al., 1997; Conte & Baumgartner, 2000). Eine weitere Möglichkeit, den Spenderpool zu vergrößern, besteht in der Adjustierung der Spenderkriterien. Durch Optimierung der Konservierungsqualität wäre es denkbar, die Nachteile, die durch das Alter des Spenders und durch die stärker vorgeschädigten Lungen entstehen, zu kompensieren. Um die Anzahl der Spender zu erhöhen, befindet sich die Transplantation von Lungen herztoter Spender [Non-Heart-Beating Donor] in der experimentellen Phase (Steen et al., 2001). Auch die von unserer Forschungsgruppe zu dieser Fragestellung durchgeführten Versuche zeigten vergleichbare Ergebnisse mit Versuchen herkömmlicher Spender. Somit könnte das Spenderkollektiv durch die an zerebrovaskulären Erkrankungen und Herzerkrankungen verstorbenen, jedoch weiterhin beatmeten Patienten vergrößert werden (Greco et al., 1999; Aitchison et al., 2001).

### *Ischämie-Reperfusionsschaden*

Der Ischämie-Reperfusionsschaden entsteht durch Interaktionen zwischen aktivierten neutrophilen Granulozyten mit dem geschädigten Gefäßendothel. Klinisch äußert er sich durch ein nicht-kardiogen bedingtes Lungenödem [siehe Kap. 2.4]. Der Ischämie-Reperfusionsschaden ist hauptverantwortlich für die hohe perioperative Mortalität von ca. 20 % (Hertz et al., 2002). Neben anderen Lösungsansätzen wird vor allem die Verbesserung der Konservierung, z. B. durch Low-Potassium-Dextran-Lösungen, diskutiert (Müller et al., 1999; Stewart & Patterson, 2001).

### *Akute Transplantatabstoßung*

Der akuten Transplantatabstoßung wird in den meisten Zentren durch eine Triple-Therapie mit Tacrolimus [FK 506], Prednisolon und Mycophenolat Mofetil [CellCept] vorgebeugt (Kur et al., 1999; Speich et al., 2001; Izbick et al., 2002). Trotz der Immunsuppressionstherapie tritt eine akute Abstoßung in 80 % der Fälle auf. Dies spielt meist keine signifikante Rolle für die klinische Morbidität, jedoch wurde gezeigt, dass zwischen der Anzahl akuter Abstoßungen und der Entwicklung einer

chronischen Transplantatabstoßung ein signifikanter Zusammenhang besteht (Bando et al., 1995).

### *Chronische Transplantatabstoßung*

Die chronische Transplantatabstoßung äußert sich histologisch in einer Bronchiolitis obliterans und physiologisch in einer Einschränkung der Ventilation, die sich in einem variablen Zeitraum nach der Transplantation entwickelt. Die Bronchiolitis obliterans ist die Haupttodesursache nach dem ersten postoperativen Jahr (Hertz et al., 2002). Die Pathogenese der Bronchiolitis obliterans ist bisher nicht genau geklärt, es werden pathogenetisch jedoch HLA-Inkompatibilität und Cytomegalievirus-Infektion diskutiert (Sundaresan et al., 1998). Ein Lösungsansatz besteht in der spezifischen Untersuchung der Pathogenitätsfaktoren, die durch einen größeren Zeitrahmen der Transplantation ermöglicht werden könnte (Devouassoux et al., 2001).

## **2.2 Historische Entwicklung der klinischen Lungentransplantation**

Einer der Pioniere in der Entwicklung der Lungentransplantation war Dr. J. Hardy [University of Mississippi], dem es am 11. Juni 1963 zum ersten Mal gelang, eine Einzel-Lungentransplantation an einem Menschen vorzunehmen. Der Patient verstarb nach 18 Tagen an akutem Nierenversagen (Hardy, 1999).

In den Jahren 1963 bis 1983 wird von insgesamt 40 Herz-Lungen- oder Lungentransplantationen berichtet (Cooper et al., 1987; Grover et al., 1997). Diese weisen bis auf einen Fall im Jahr 1971 keine Langzeiterfolge auf (Derom, 1971).

Dank verbesserter Operationstechniken und Konservierungsverfahren sowie der Einführung des Cyclosporins zur Verhinderung der Transplantatabstoßung gelang es Dr. J. Cooper [University of Toronto] in den Jahren 1983-1985 einen Meilenstein in der Lungentransplantationschirurgie zu setzen. Von sieben durchgeführten Transplantationen wiesen fünf gute Langzeitergebnisse auf (Grover et al., 1997).

In der Zeit zwischen 1985 und 1995 erhöhte sich die Zahl der erfolgreich durchgeführten Transplantationen von 13 auf 1341 pro Jahr. Aufgrund des Mangels an Spenderorganen hat die Anzahl der Operationen seit 1995 jedoch ein Plateau erreicht (Stewart & Patterson, 2001; Hertz et al., 2002). Auch die Qualität der

Lungentransplantation hat sich in den ersten Jahren konstant verbessert, was sich durch steigende Überlebensraten belegen lässt. Ende der achtziger Jahre betrug die 1- bzw. 5-Jahresüberlebensrate ca. 65 % bzw. 40 %. In den frühen neunziger Jahren stiegen die entsprechenden Überlebensraten auf 75 % bzw. 50 %. Bis heute konnte keine wesentliche Verbesserung der Überlebensrate erreicht werden (Hertz et al., 2002).

## **2.3 Struktur und Funktion der Lunge**

Der Alveolus ist neben den für die Aerodynamik notwendigen Strukturen des Tracheobronchialsystems das funktionell wichtigste Element des gesamten Respirationstraktes. In den Alveolen findet der Gasaustausch statt. Sie bestehen aus sechskantigen bis kugelförmigen Lufträumen mit einem mittleren Durchmesser von 250-300 µm bei maximaler Entfaltung. Die Wände der Alveolen werden von den Interalveolarsepten gebildet. Benachbarte Alveolen besitzen jeweils eine gemeinsame Wand. Die Gesamtzahl der Alveolen beträgt in Abhängigkeit von der Körpergröße 200-600 Millionen. Die Größe der Alveolen hängt vom Lungenvolumen ab. Die geringere Größe der Alveolen in den abhängigen Lungenpartien ist für den pulmonalen Gasaustausch von Bedeutung. Die von den Alveolarwänden gebildete Gasaustauschfläche beträgt 70-140 m<sup>2</sup> und ist abhängig vom Geschlecht, von der Körpergröße und vom Alter (Gehr et al., 1978; Crapo et al., 1982).

Die Interalveolarsepten werden aus dem Bindegewebsseptum, dem alveolären Kapillarnetz und dem Alveolarepithel gebildet [Abbildung 1].

Das Bindegewebe der Interalveolarsepten besteht aus kollagenen und retikulären Bindegewebsfasern sowie einem dichten elastischen Fasernetz, der Fortsetzung des elastischen Fasersystems, der Wände von Bronchiolen und dem peribronchiolären Gewebe. Die Interalveolarsepten sind zwischen dem Bronchialbaum und der Lungenoberfläche elastisch aufgespannt. Bei der Inspiration werden die Kollagenfasern vollständig gestreckt und verhindern jede weitere Dehnung. Gleichzeitig werden die elastischen Fasern etwa auf das Doppelte ihrer Ursprungslänge gedehnt und können während der Expiration auf ca. 60 % ihrer

Länge verkürzt werden, ohne dass hierdurch der gestreckte Verlauf verloren geht. Dies ist für die Interalveolarsepten von Bedeutung, denn sie bleiben somit bis zu einer Reduktion der Alveolen auf 20 % ihres maximalen Volumens gestreckt und legen sich bei einer weiteren Abnahme des Lungenvolumens in Falten. Die elastischen und kollagenen Fasern der Interalveolarsepten sind in eine dünne Schicht interstitieller Grundsubstanz eingebettet, in der sich Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen und Leukozyten befinden. An der Grenze zum Alveolarepithel verdichtet sich das Bindegewebe an beiden Seiten zu einer Basalmembran. Insgesamt bildet das Bindegewebe der Interalveolarsepten keine geschlossene Schicht, sondern eine Platte mit zahlreichen großen Löchern und einem Netzwerk aus weitmaschigen Faserbündeln (Crapo et al., 1982).

Das einschichtige Kapillarnetz der Alveolen wird von der Bindegewebsplatte getragen. Eine Kapillarseite ist mit der Platte verbunden, die andere wölbt sich in den Alveolarraum vor.

Die Alveolen werden vollständig von Alveolarepithel ausgekleidet. Das Alveolarepithel bedeckt beide Seiten der Bindegewebsplatte sowie das mit der Platte verflochtene Kapillarnetz. Zwei Typen von Epithelzellen [Pneumozyten] können unterschieden werden: Pneumozyten Typ-1 und Pneumozyten Typ-2.

Pneumozyten Typ-1 haben eine Größe von 50-150 nm. Sie bilden eine kontinuierliche Zellschicht und werden als Deckzellen der Interalveolarsepten bezeichnet. Diese Zellen bedecken mehr als 90 % der Oberfläche der Interalveolarsepten. Der Zellkern befindet sich in einer Masche des Kapillarnetzes. Die Zellfortsätze breiten sich großflächig aus und überziehen die Kapillaren und das Bindegewebsseptum. An der direkten Auflagestelle von Epithelzelle und Kapillare verschmelzen ihre beiden Basallamina miteinander, sodass eine dünne, fest miteinander verbundene Diffusionsbarriere entsteht. Ein Teil der Fortsätze der Typ-1-Zellen zieht mit einer Kapillare durch die Löcher der Bindegewebsplatte und bildet dort eine großflächige Epithelbekleidung. Die Fortsätze der Epithelzellen sind durch *tight junctions* fest miteinander verbunden. Hierdurch wird der interstitielle Raum gegen das Alveolarlumen abgedichtet. Ein Teil der Interalveolarsepten ist durch Alveolarporen verbunden. Diese Poren sind mit Fortsätzen der Alveolarepithelzellen ausgekleidet (Bachofen & Weibel, 1982).

Pneumozyten Typ-2 sind große Zellen, die meist einzeln zwischen den Typ-1-Pneumozyten liegen und nur ca. 70 % der Alveolaroberfläche bedecken. Typ-2-Zellen produzieren vor allem Phospholipide und außerdem spezifische Proteine, die zusammen mit den Phospholipiden sezerniert werden und sich als gemeinsamer, monomolekulärer Protein-Phospholipid-Film [Surfactant] über die gesamte Oberfläche der Alveolen ausbreiten. Dieser Film setzt die Oberflächenspannung der Lunge herab und stabilisiert die Alveolen. Surfactant wird von Typ-1-Zellen und Alveolarmakrophagen resorbiert und von Typ-2-Zellen ständig neu gebildet. Daneben bilden Typ-2-Zellen neue Typ-1-Zellen, die selbst nicht teilungsfähig sind. Alveolarmakrophagen werden als Monozyten im Knochenmark gebildet. Sie wandern über das Blut in die Interalveolarsepten, verlassen dort die Kapillaren, durchdringen das Epithel und gelangen auf die Oberfläche von Typ-1-Epithelzellen. Die Funktion der Alveolarmakrophagen besteht in der Aufnahme von Keimen, Staub- und Rußpartikeln sowie ausgetretenen Erythrozyten und zerstörtem Alveolargewebe.

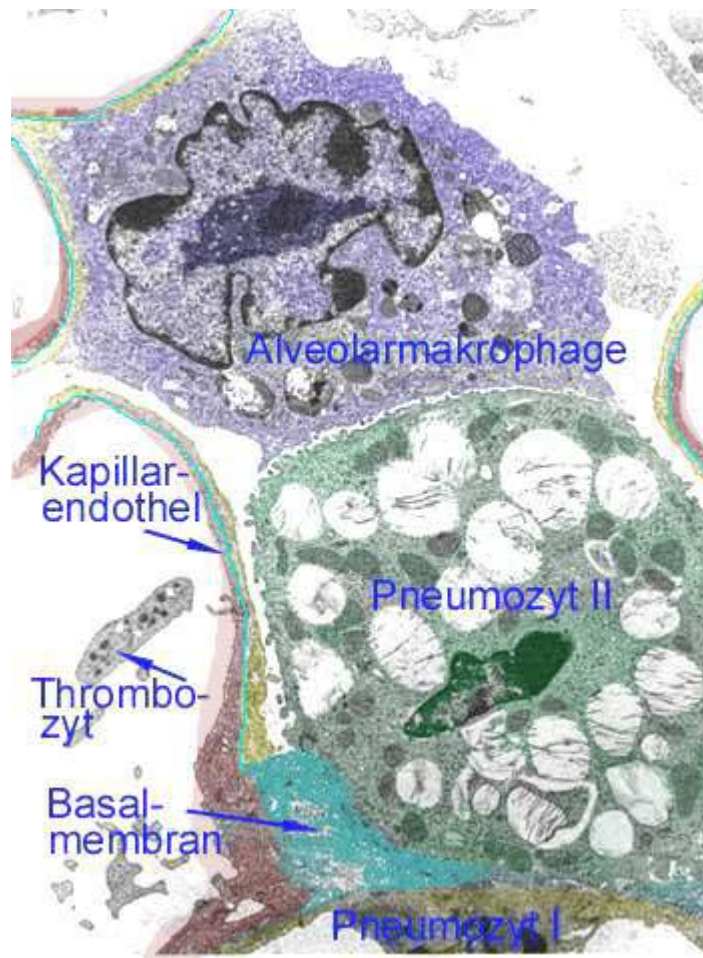
### *Blut-Luft-Schranke*

Die Alveolarsepten bilden die Diffusionsbarriere zwischen Blut und Luft. Hier werden die Gase durch einfache Diffusion ausgetauscht. Die dünnste und somit kürzeste Strecke für den Gasaustausch findet sich an der Verschmelzungsstelle der Basalmembran des Alveolarepithels und der Kapillaren. In diesem für den Gasaustausch bevorzugten Bereich mit einem Durchmesser von 0,2-0,4 mm müssen die Gase folgende Barrieren überwinden [Abbildung 1]:

1. Plasma zwischen Erythrozyt und Endothel
2. Zytoplasma der Kapillarendothelzellen
3. verschmolzene Basalmembranen von Kapillare und Alveolarepithel
4. Zytoplasma der Pneumozyten Typ-1
5. Surfactant der Alveolen

Die Diffusionsbarriere hat ihren größten Durchmesser an der dem Bindegewebsseptum zugewandten Seite. Hier müssen zusätzlich zu oben aufgeführten Strukturen das Septum mit seinen Fasern und Zellfortsätzen sowie die

Endothelzellkerne überwunden werden. In diesem Bereich ist daher die Gasaustauschfunktion eingeschränkt (Gehr et al., 1978; Crapo et al., 1982).



**Abbildung 1: Lungenalveole, Vergrößerung 9.400-fach [www.elmi.uni-hd.de, 1999]**

- Alveolarmakrophage [blau] gehört zum "Mononukleären Phagozytären System [MPS]". Er enthält Lysosomen und [im Vergleich zum Pneumozyten II] wenige Mitochondrien. Er phagozytiert Substanzen, die sowohl vom Alveolarlumen [z. B. Surfactant, Staub, Teer] als auch aus dem Blut [Herzfehlerzellen] stammen können.
- Pneumozyt I [gelb] kleidet in erster Linie [95%] die Alveolen zur Atemluft hin aus.
- Pneumozyt II [grün] bildet in erster Linie Surfactant, der in den multilamellären Körperchen in seinem Inneren gespeichert wird.
- Blutkapillaren [rot] besitzen ein kontinuierliches [nicht-fenestriertes] Endothel, das häufig nur etwa 1-2 µm dick ist. Im Kapillarlumen ist ein Thrombozyt zu erkennen.
- Basalmembran [zyanblau]: gemeinsame Basalmembran der Alveolarepithelzellen und der Kapillarendothelzellen, die oft sehr dünn ist.
- "Blut-Luft-Schranke" = Pneumozyten I-Fortsätze + Basalmembran + Kapillarendothel



## **2.4 Ischämie- und Reperfusionsschaden**

Der Ischämie-Reperfusionsschaden im Rahmen der Lungentransplantation beschreibt die Summe aller Schäden, die im Zusammenhang mit Ischämie, Hypothermie, Perfusion und Reperfusion auftreten. Der Mechanismus ist noch nicht in jeder Einzelheit vollständig aufgeklärt. Der Ischämie-Reperfusionsschaden ist vor allem für die postoperative Mortalität in den ersten 72 Stunden verantwortlich. Er äußert sich in einem unspezifischen Alveolarschaden, einem Lungenödem und einer Hypoxämie. Das klinische Bild variiert von leichter Hypoxämie mit wenigen Infiltraten bis zur Ausprägung eines ARDS (King et al., 2000). Ein besseres Verständnis der einzelnen zellulären Mechanismen der Lungenschädigung im Organspender, der Ischämie im Rahmen der Organexplantation, der Reperfusion sowie der Organerwärmung und Sauerstoffaufsättigung ermöglicht eine gezielte Intervention. Dies trägt zur Entwicklung von effektiveren Konservierungsverfahren und einer verbesserten Transplantatfunktion bei.

### **2.4.1 Einfluss des Organspenders**

Der Erfolg der Lungenkonservierung hängt in erster Linie von einer sorgfältigen Auswahl der Spenderorgane ab. Bereits der Hirntod kann eine homöostatische Fehlregulation auslösen, die zu einer Störung der pulmonalen endokrinen Funktion und einer starken pulmonalen Entzündungsreaktion führen kann. Dies kann eine verminderte Toleranz des Organs gegenüber Hypoxieschäden während der Ischämiephase zur Folge haben (Mertes et al., 1994; Bittner et al., 1995; Kusaka et al., 2000). Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-8 [IL-8] zeigt sich in der bronchoalveolären Lavage und im Lungengewebe hirntoter Spender erhöht. In diesem Zusammenhang konnte eine signifikante Korrelation zwischen IL-8 und der akuten Transplantatdysfunktion nach Reperfusion gezeigt werden (Fisher et al., 2001; de Perrot et al., 2002). Das Spenderorgan ist neben den inflammatorischen Schädigungen infolge des Hirntods möglicherweise auch einer langen Beatmungsphase, Infektionen und Phasen von Hypotension ausgesetzt. Die hämodynamische Instabilität kann durch mögliche pulmonale Mikroinfarkte, metabolische Entgleisungen und Flüssigkeitsverschiebungen zur Ausbildung eines pulmonalen Gewebeödems führen. Die prolongierte mechanische Ventilation stellt

darüber hinaus ein signifikantes Risiko für pulmonale Infektionen und physikalische Schädigungen der Lunge dar.

### **2.4.2 Einfluss der kalten Organischämie**

Hypothermie setzt die metabolische Aktivität der Zellen herab. Deshalb sind biochemische Reaktionen vermindert, und der Zerfall essenzieller zellulärer Komponenten wird verlangsamt. Die meisten Enzymsysteme zeigen eine 1,5- bis 2-fache Reduktion ihrer Aktivität bei einer Erniedrigung der Temperatur um 10 °C (Clavien et al., 1992). Obwohl die Hypothermie essenziell für die erfolgreiche Organkonservierung ist, können verschiedene Ereignisse eintreten, die zur Aktivierung von Entzündungsmediatoren führen und damit zu einer Schädigung des konservierten Organs während der Reperfusion beitragen.

#### **2.4.2.1 Oxidativer Stress**

Oxidativer Stress wird charakterisiert durch die Produktion von freien Sauerstoffradikalen, Hydrogenperoxid und Hydroxylradikalen (McCord, 1985). Diese Moleküle sind hochgradig instabil und reagieren mit der ersten Struktur, auf die sie treffen – normalerweise die Lipidkomponente der Zellmembran. Der durch die Lipidperoxidation ausgelöste Zellschaden kann von einer erhöhten Zellmembranpermeabilität bis zur Zellyse variieren. Die Bildung von intrazellulären Sauerstoffradikalen erfolgt in den meisten Zellen des Lungenparenchyms. Dazu gehören Endothelzellen, Pneumozyten Typ-II, Clara-Zellen und Alveolarmakrophagen (Al-Mehdi et al., 1997). Die Gewebsaktivität von Malondialdehyd gilt als Maß für die Lipidperoxidation (Erkasap & Ates, 2000). Malondialdehyd entsteht als Endprodukt der Lipidperoxidation (Eschwege et al., 1999). Wie von Mangino und Yamashita beschrieben, kann eine erhöhte Malondialdehyd-Konzentration als Index des Reperfusionsschadens gesehen werden (Mangino et al., 1996; Yamashita et al., 1996).

Die Produktion freier Sauerstoffradikale kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen beschrieben werden:

Im ersten Mechanismus geht man davon aus, dass der durch die Ischämie verursachte Energieverlust zu einer Störung des zellulären Ionengleichgewichts führt.

Daraus resultiert eine Aktivitätsminderung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Es kommt zu einem Kaliumausstrom aus den Lungenepithelzellen und zum Kalziumeinstrom. Die einströmenden Kalziumionen aktivieren zelluläre Proteasen, die unter anderem das Enzymsystem Xanthinoxidase in den aktivierten Zustand versetzen. Außerdem steht aufgrund des Abbaus von energiereichem ATP zu Hypoxanthin ausreichend Substrat für die Xanthinoxidase zur Verfügung. Nach Reoxygenierung katalysiert die Xanthinoxidase die Umsetzung von Hypoxanthin mit molekularem Sauerstoff zu Xanthin und hochreaktiven freien Sauerstoffradikalen (Kelly, 2000).

Der zweite Mechanismus wird durch das System der NADPH-Oxydase beschrieben. Das NADPH-Oxydase-System befindet sich hauptsächlich auf der Membranoberfläche von neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten/ Makrophagen. Es katalysiert die Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid und freien Sauerstoffradikalen (Kelly, 2000).

In der Organtransplantation wird meist die Ischämie-Reperfusion und die Anoxie-Reoxygenierung gleichgesetzt. Im Hinblick auf die Lunge ist dies nicht möglich, da die Alveolen während der ischämischen Konservierungsphase Sauerstoff enthalten. Alveolärer Sauerstoff trägt zur Erhaltung des aeroben Stoffwechsels bei und verhindert die Hypoxie des Lungenparenchyms (Fisher et al., 1991; Eckenhoff et al., 1992; Date et al., 1993b). Deshalb wird der oxidative Stress, der durch Ischämie entsteht, vom hypoxischen, oxidativen Stress unterschieden.

Hypoxie und Anoxie bewirken eine Abnahme von ATP, einen damit verbundenen Anstieg des ATP-Abbauprodukts Hypoxanthin und somit die Bildung von Sauerstoffradikalen in der Reperfusion (Fisher & Dodia, 1981).

Ischämie der Lunge bedeutet, dass das Organ nicht perfundiert ist. Dies kann eine Lipidperoxidation hervorrufen und resultiert in einer Schädigung der Lunge durch Sauerstoffradikale trotz der Anwesenheit von Sauerstoff (Fisher et al., 1991; Zhao et al., 1997b). Der Mechanismus des oxidativen Stress unterscheidet sich von dem der Anoxie-Reoxygenierung bei der Transplantation anderer Organe. Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Organschädigung und dem ATP-Verbrauch. Somit kann es auch während der Lagerung des Organs zu einer Schädigung des Parenchyms kommen. Den Vorgang durch Inhibitoren der Xanthinoxidase zu stoppen ist nicht möglich (Fisher et al., 1991; Eckenhoff et al., 1992; Zhao et al., 1997b; Al-Mehdi et al., 1998b).

Es wird diskutiert, dass das Endothel eine wichtige Rolle als Quelle von Oxidantien während der nicht-hypoxischen Lungenischämie spielt (Al-Mehdi et al., 1998b). Endothelzellen reagieren sehr empfindlich auf mechanische Kräfte, wie sie z. B. durch Veränderungen des Blutstroms entstehen. Durch Mechanotransduktion sind die Zellen in der Lage, diese Kräfte in elektrische und biochemische Signale umzuwandeln (Lansman, 1988). Das Fehlen der mechanischen Komponente des Blutstroms während der Ischämiephase stimuliert die Membrandepolarisierung der Endothelzellen durch Aktivierung der NADPH-Oxydase und der Kalzium/Calmodulin-abhängigen NO-Synthase (Al-Mehdi et al., 1998b; Al-Mehdi et al., 1998a). Makrophagen und neutrophile Granulozyten können durch ihre hohe Aktivität der NADPH-Oxydase ebenfalls zur Radikalbildung während der Ischämiephase beitragen (Kitagawa & Johnston, 1985; Henderson et al., 1988).

#### 2.4.2.2 Inaktivierung der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist wichtig, um die physiologische intrazelluläre Elektrolytkonzentration zu erzeugen [hohe  $\text{K}^+$ -, niedrige  $\text{Na}^+$ -Konzentration] und einen adäquaten Abtransport der alveolaren Flüssigkeit zu gewährleisten. Während der hypothermen Lagerung des Organs verliert die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ihre Aktivität, die sie erst nach einer Erwärmung auf 37 °C zurückgewinnt (Ware et al., 1999). Der Funktionsverlust der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase führt zu einem Anstieg der  $\text{Na}^+$ -Konzentration und damit zu einer Volumenverschiebung in die Zelle. Daraus resultieren ein Einstrom von Chlorid in die Zelle und ein Ausstrom von Kaliumionen aus der Zelle. Konservierungslösungen bestehen aus Elektrolyten und Kolloiden. Dadurch kann ein osmotischer Druckgradient aufgebaut werden, der die Entstehung eines hypothermieinduzierten intrazellulären Ödems verhindern soll. Es wurde nachgewiesen, dass die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zur Zeit der Wiedererwärmung der Lunge eine erheblich größere Aktivität besitzt, wenn das Organ mit einer Konservierungslösung mit geringer  $\text{K}^+$ -, aber hoher  $\text{Na}^+$ -Konzentration konserviert wurde (Sugita et al., 1999).

#### 2.4.2.3 Einfluss der intrazellulären Kalziumkonzentration

Die hypotherme Lagerung greift in den Kalziumstoffwechsel der Zelle ein. Dabei wird Kalzium aus intrazellulären Depots freigesetzt, und es kommt zu einem pathologischen Einstrom der Kalziumionen durch die Plasmamembran. (Clavien et al., 1992).

Die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration hat auf viele zelluläre Prozesse Einfluss und kann zu zellulären Schäden führen (Clavien et al., 1992). So wird z. B. verstärkt Xanthinoxidase gebildet, welche den schädigenden Effekt der freien Radikale verstärkt (McCord, 1985).

#### 2.4.2.4 Freisetzung von Eisen

Obwohl Eisen ein lebenswichtiges Element für alle Zellen ist, kann es aufgrund seiner Fähigkeit, Oxidantien zu bilden, hoch toxisch wirken. In seiner ionisierten Form kann Eisen zwischen einem oxidierten [ $\text{Fe}^{3+}$ ] und einem reduzierten Zustand [ $\text{Fe}^{2+}$ ] wechseln und katalysiert so die Transformation von Wasserstoffperoxid und  $\text{O}_2^-$  zu hoch reaktiven Hydroxylradikalen [Fenton-Reaktion]. Freies Eisen kann während der Ischämiephase aus Ferritin und Cytochrom P-450 freigesetzt werden (Bysani et al., 1990; Zhao et al., 1997a; Huang et al., 2001).

### **2.4.3 Folgen der Organreperfusion**

#### 2.4.3.1 Zellmembranmoleküle

Adhäsionsmoleküle werden in drei Hauptgruppen unterteilt: Selektine, Immunglobuline und Integrine. Adhäsionsmoleküle der pulmonalen Endothelzellen werden während der Ischämiezeit verstärkt exprimiert und vermitteln die Einwanderung von Leukozyten in das Lungenparenchym. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der Adhäsionsmoleküle wie z. B. P-Selektin, intracellular adhesion molecule-1 [ICAM-1] und CD18 zur Zeit der Reperfusion den Ischämie-Reperfusionsschaden verringert (Kapelanski et al., 1993; Moore et al., 1995; DeMeester et al., 1996; Naka et al., 1997a; Minamiya et al., 1998).

Hypoxie regt Endothelzellen und Makrophagen an, prokoagulatorische Eigenschaften zu entwickeln, die zur Bildung von mikrovaskulären Thromben beitragen und den Blutfluss nach der Reperfusion behindern. Es wurde nachgewiesen, dass während der kalten Ischämiephase die Produktion von antikoagulativen Cofaktoren wie Thrombomodulin vermindert ist (Ogawa et al., 1990). Gleichzeitig werden Gewebefaktoren auf Endothelzellen und Makrophagen verstärkt ausgebildet und spielen eine signifikante Rolle bei der Ausbildung des Ischämie-Reperfusionsschadens. Die An-

wendung eines C1-Esterase-Inhibitors, welcher sowohl den klassischen Weg des Komplementsystems als auch den intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade hemmt, verbesserte die frühe Transplantatfunktion und verminderte den Ischämie-Reperfusionsschaden (Salvatierra et al., 1997).

#### 2.4.3.2 Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren

Klinische und experimentelle Studien haben gezeigt, dass der Prozess der Ischämie und Reperfusion von Organen wie Niere, Leber, Herz und Lunge eine schnelle Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen zur Folge hat (Serrick et al., 1994; Oz et al., 1995; Gerlach et al., 1999; Lemay et al., 2000). In der humanen Lungentransplantation wurden pro- und antiinflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8, IL-10, IL-12 und IL-18 in der kalten Ischämiephase und nach Reperfusion im Lungengewebe gefunden (de Perrot et al., 2002). Obwohl die Konzentration vieler Cytokine nach der Reperfusion wieder zurückgeht, bleibt IL-8 signifikant erhöht. Spenderparameter wie die Art des Hirntodes, Rauchen, positive Sputumkulturen und die Zeit an der Beatmung haben keinen Einfluss auf die Zytokine. Das Alter des Spenders korreliert mit der Konzentration von IL-10 nach der Reperfusion. Dies wird als Erklärung diskutiert, warum ältere Spenderlungen anfälliger für den Ischämie-Reperfusionsschaden sind (Hosenpud et al., 2000).

Es besteht eine Beziehung zwischen IL-8 und der Transplantatfunktion. IL-8 ist ein Promotor für die Einwanderung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Die Menge von IL-8 im Lungengewebe zwei Stunden nach Reperfusion korreliert negativ mit der Lungenfunktion und wirkt sich auch negativ auf die Überlebensrate aus (de Perrot et al., 2002).

Zelluläre Schäden werden begleitet von einem schnellen Umbauprozess der Membranlipide und der Synthese von bioaktiven Lipiden, die als intra- oder extrazelluläre Mediatoren wirken können. Phospholipasen wie Phospholipase A<sub>2</sub>, C und D spielen eine zentrale Rolle in der Bildung von Lipidmediatoren. Die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> induziert die Produktion von platelet-activating-factor [PAF], einem starken Entzündungsmediator. Außerdem wird die Arachidonsäure mobilisiert und über zwei Wege zu Eicosanoiden verstoffwechselt. Das vaso- und bronchokonstriktische Thromboxan A<sub>2</sub> sowie die Prostaglandine PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2</sub> werden über den Cyclooxygenaseweg produziert. Über die Lipoxygenase

werden Leukotriene katalysiert, die die kapilläre Permeabilität steigern können (Arbibe et al., 1998).

PAF wird von vielen verschiedenen Zellen freigesetzt. Hierzu gehören Makrophagen, Thrombozyten, Endothelzellen, Mastzellen und neutrophile Granulozyten. Nach der PAF-Bindung an den PAF-Rezeptor werden Leukozyten aktiviert, die Thrombozytenaggregation stimuliert und die Freisetzung von Zytokinen angeregt. In Studien wurde gezeigt, dass PAF eine kritische Rolle während der Ausbildung eines Ischämie-Reperfusionsschadens spielt (Miotla et al., 1998; Nagase et al., 1999).

Die Aktivierung des Komplementsystems nach der Reperfusion führt sowohl auf dem direkten als auch auf dem indirekten Weg zur Schädigung der Zellen (Bishop et al., 1991; Naka et al., 1997b). Produkte des Komplementsystems bewirken eine Kontraktion der glatten Muskulatur, erhöhen die Gefäßpermeabilität und veranlassen die Degranulierung von Phagozyten, Mastzellen und basophilen Granulozyten (Frank, 1987).

Endotheline sind starke Vasokonstriktoren. Sie sind zehnmal stärker wirksam als Angiotensin II oder Vasopressin (Boscoe et al., 2000). In der Lunge wird Endothelin-1 von Endothelzellen und den glatten Muskelzellen freigesetzt. Neben der Vasokonstriktion ist Endothelin-1 in der Lage, die Produktion von Zytokinen zu stimulieren und die Retention von neutrophilen Granulozyten zu fördern (Sato et al., 2000).

#### 2.4.3.3 Leukozytenfunktion

Es wird diskutiert, dass der Ischämie-Reperfusionsschaden in zwei Phasen abläuft, die frühe Phase der Reperfusion, die vor allem von der Qualität des Spenderorgans abhängig ist und die späte Phase, die besonders von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten des Empfängers beeinflusst wird (Eppinger et al., 1995; Sommers et al., 1996; Eppinger et al., 1997; Fiser et al., 2001). Die Aufnahme von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe resultiert aus der Freisetzung von Zytokinen und anderer Mediatoren während und nach der Reperfusion.

Alveoläre Makrophagen setzen in großer Anzahl Zytokine [z. B. IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ] frei, welche den Reperfusionsschaden unmittelbar nach der Reperfusion erheblich beeinflussen können (Naidu et al., 2002).

Neben Lymphozyten und Makrophagen spielen auch die neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle bei der Entstehung eines Ischämie-Reperfusionsschadens. Neutrophile Granulozyten infiltrieren die transplantierte Lunge während der ersten 24 Stunden nach Reperfusion (Adoumie et al., 1992). Eine große Bedeutung für deren Einwanderung besitzen Adhäsionsmoleküle, wie z. B. P- und E-Selektine, über die neutrophile Granulozyten an die geschädigten Endothelzellen binden und zur Sequestration der Entzündungszellen in das Interstitium führen (Steinhoff et al., 1995). Die Freisetzung von Lipasen, Proteasen und Sauerstoffradikalen führt zu einer direkten Gewebsschädigung. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die neutrophilen Granulozyten in der frühen Phase nach der Reperfusion keinen großen Anteil am Entstehen des Ischämie-Reperfusionsschadens haben, sondern erst die spätere Phase (ca. 4 Stunden) nach Reperfusion entscheidend beeinflussen (Eppinger et al., 1995; Lu et al., 1997).

## **2.5 Prinzipien der Lungenkonservierung**

### **2.5.1 Konservierungslösungen**

Die Konservierungslösungen haben einen großen Anteil an der Qualität der Organkonservierung. Sie tragen entscheidend dazu bei, die Lebensfähigkeit von Endothel und Parenchym sowie die physiologischen Mechanismen der vaskulären Homöostase aufrechtzuerhalten.

Es gibt eine Vielzahl an verschiedenen Konservierungslösungen, die in intrazelluläre Lösungen [hohe  $K^+$ -, niedrige  $Na^+$ -Konzentration] und extrazelluläre Lösungen [niedrige  $K^+$ -, hohe  $Na^+$ -Konzentration] unterteilt werden. Zu den intrazellulären Lösungen zählen z. B. die Euro-Collins [EC] und die University of Wisconsin [UW] Lösung, während man Celsior und die Low-Potassium-Dextran [LPD] Lösungen zu den extrazellulären Lösungen rechnet. Die Zusammensetzung der Konservierungslösungen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Konservierungslösungen für die Lungentransplantation konnten vielfach von bereits existierenden Konservierungslösungen anderer Organe übernommen werden. So



wurden z. B. die EC-Lösung zur Nierenkonservierung und die Celsior-Lösung zur Herzkonservierung entwickelt. Die LPD-Lösung ist die einzige Konservierungslösung, die aufgrund theoretischer Überlegungen speziell für die Lungenkonservierung entwickelt wurde.

**Tabelle 1: Zusammensetzung aktueller Konservierungslösungen**

<b>Zusammensetzung</b>	<b>EC</b>	<b>UW</b>	<b>Celsior</b>	<b>LPD-Glukose (Perfadex)</b>
<b><u>Elektrolyte</u></b>				
Natrium	10,00	28,00	100,00	138,00
Kalium	115,00	125,00	15,00	6,00
Chlorid	15,00	-	41,50	142,00
Magnesium	-	-	13,00	0,80
Kalzium	-	-	0,26	0,30
<b><u>Kolloide</u></b>				
Dextran 40	-	-	-	50,00
<b><u>Puffer</u></b>				
Sulfat	-	4,00	-	0,80
Phosphat	57,50	25,00	-	0,80
Bikarbonat	10,00	5,00	-	1,00
Histidin	-	-	30,00	-
<b><u>Impermeantien</u></b>				
Glukose	3,50	-	-	0,90
Raffinose	-	30,00	-	-
Glutamat	-	-	20,00	-
Mannitol	-	-	60,00	-
Lactobionat	-	100,00	80,00	-
<b><u>Radikalfänger</u></b>				
Glutathion	-	3,00	3,00	-
Allopurinol	-	1,00	-	-
<b><u>ATP-Vorstufen</u></b>				
Adenosin	-	5,00	-	-

Alle Einheiten in mmol/l mit Ausnahme von Dextran 40 und Glukose mit der Einheit g/l  
EC: Euro-Collins-Lösung; UW: University of Wisconsin-Lösung; LPD: Low-Potassium-Dextran

Der hohe Kaliumgehalt einer Konservierungslösung hat eine pulmonale Vasokonstriktion mit Zellödem zur Folge und erschwert zudem die homogene Verteilung des Perfusats (Kimblad et al., 1991; Ono et al., 1998). Bereits in den achtziger Jahren demonstrierten Fujimura et al., dass eine modifizierte extrazelluläre Lösung bessere Ergebnisse in der Lungenkonservierung erzielt als die auf EC-Lösung basierenden intrazellulären Lösungen (Fujimura et al., 1987). Die kanadische

Arbeitsgruppe von Keshavjee nutzte die Vorteile der Low-Potassium-Lösungen und kombinierte sie mit den guten ödemreduzierenden und rheologischen Eigenschaften von Dextran 40 (Keshavjee et al., 1992). Durch die Verwendung der entstandenen LPD-Lösung zeigte sich daraufhin eine signifikant bessere Lungenfunktion des Transplantats im Vergleich zur EC-Lösung nach 12 Stunden kalter Ischämie (Keshavjee et al., 1989).

Die niedrige Kaliumkonzentration fördert die strukturelle und funktionelle Integrität der Endothelzelle, indem sie die Produktion von Oxidantien und die Freisetzung von pulmonalen Vasokonstriktoren verringert (Yamazaki et al., 1990; Kimblad et al., 1991; Sasaki et al., 1995; Al-Mehdi et al., 1998b; Bando et al., 1998). Dextran 40 ist ein Makromolekül mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 40000 D und einem daraus resultierenden onkotischen Druck von 24 mmHg in einer 5 %-igen Lösung (Spaggiari & Bobbio, 1994). Dextran wirkt antithrombotisch, indem es die Endotheloberfläche der Gefäße überzieht, die Verformbarkeit der Erythrozyten verbessert und die Erythrozytenaggregation verhindert (Keshavjee et al., 1992).

Dieser Effekt verbessert die pulmonale Mikrozirkulation und unterstützt die Funktion der Blut-Luft-Schranke. Dies führt zu einem verminderten Austritt von Proteinen und Wasser aus den pulmonalen Gefäßen und beugt somit einem Ödem zur Zeit der Reperfusion vor (Schneuwly et al., 1999).

Darüber hinaus konnte in *in-vitro* Studien gezeigt werden, dass die LPD-Lösungen im Vergleich zur EC-Lösung weniger zytotoxisch auf Pneumozyten Typ-II wirken. Zudem haben sie einen positiven Effekt auf die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase während der kalten Ischämiephase (Suzuki et al., 2000). Dies führt zu einer geringeren Lipidperoxidation und einer verbesserten Funktion des Surfactants am Ende der Ischämiephase und nach der Reperfusion (Strüber et al., 2000).

Mit der Zugabe von 1 % Glukose zur LPD-Lösung konnte die Ischämiezeit auf 24 Stunden verlängert werden. Dies basiert auf der Bereitstellung von Substrat für den aeroben Stoffwechsel in der mit Sauerstoff geblähten Lunge. Die LPD-Glukose Lösung wird unter dem Namen Perfadex [Vitrolife, Göteborg, Schweden] kommerziell vertrieben. Aufgrund der signifikanten Überlegenheit bezüglich Mortalität und Lungenfunktion im Vergleich mit anderen Lösungen ist Perfadex in vielen

Transplantationszentren die Konservierungslösung der ersten Wahl (Date et al., 1993b; Steen et al., 1993; Steen et al., 1994b).

Das Vorhandensein eines osmotisch impermeablen Zuckers in einer Konservierungslösung ist von großer Bedeutung, da er die Fähigkeit besitzt, die Wasserdiffusion und somit die Ausbildung eines zellulären Ödems zu verhindern. Trisaccharide wie Raffinose haben einen größeren Effekt auf die Wasserdiffusion als Mono- oder Disaccharide (Hopkinson et al., 1996). Die Raffinose ist ein wesentlicher Bestandteil der UW-Lösung, die von ca. 15 % der Transplantationszentren in der klinischen Praxis genutzt wird (Love et al., 1996). Die Kombination der LPD-Glukose Lösung mit Raffinose zeigte im Tiermodell eine verbesserte Oxygenierung der transplantierten Lunge (Fischer et al., 2001).

Die Celsior-Lösung [Sangstat, Fremont, US] stellt ein neuartiges Konzept der extrazellulären Konservierungslösung dar. Sie zeigt gute Ergebnisse in der experimentellen Lungenkonservierung, obwohl sie speziell für die Herzkonservierung entwickelt wurde (Reignier et al., 1995; Roberts et al., 1999; Wittwer et al., 1999a; Xiong et al., 1999). Die Lösung ist zusammengesetzt aus dem Antioxidans Glutathion sowie den Substanzen Histidin und Lactobionat, die eine Zellschädigung durch freie Sauerstoffradikale vermindern. Außerdem wird durch den Zusatz osmotisch wirksamer Stoffe wie Mannitol der Ausbildung eines Zellödems vorgebeugt. Die Vasokonstriktion wird durch den Zusatz von Glutamat sowie dem Kalziumchelatbildner Lactobionat verhindert. Der hohe Magnesiumgehalt verhindert einen übermäßigen Kalziumeinstrom in die Mitochondrien und begünstigt so die mitochondriale ATP-Synthese. In Studien der eigenen Forschungsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Celsior im Vergleich zur EC-Lösung eine signifikant bessere Konservierungsqualität aufweist (Fehrenbach et al., 1999; Wittwer et al., 1999b; Wittwer et al., 1999c; Fehrenbach et al., 2000).

In der Literatur wird sowohl in klinischen als auch in experimentellen Studien die LPD-Glukose Lösung als Konservierungslösung der Wahl für die Lungentransplantation beschrieben. Dennoch stellt die modifizierte EC-Lösung noch immer den internationalen Standard dar.

## **2.5.2 Physikalische und chemische Beeinflussung**

### 2.5.2.1 Hypothermie

Trotz des zellulären Schadens, den man der hypothermen Lagerung des Organs zuschreiben kann [s. Kapitel 2.4.2], kommt der optimalen Temperatur eine große Bedeutung in der Qualität der Organkonservierung zu. Hypothermie verringert die Aktivität der katabolen, zellulären Enzymsysteme, die unter normothermer Ischämie zu einem schnellen Verlust der zellulären Lebensfähigkeit beitragen (Pegg, 1986). Die Hypothermie ist eine der Hauptkomponenten der Lungenkonservierung, sowohl in Form der topischen Kühlung als auch während der Flush-Perfusion (Baldwin et al., 1987). Das Standardverfahren stellt immer noch die Lagerung wie auch die Flush-Perfusion bei 4 °C dar (Mayer et al., 1992; Kirk et al., 1993; Gorler & Haverich, 2000). Mit einer Flush-Perfusion von 4 °C kann das Lungenparenchym schnell auf eine Temperatur von ca. 15 °C abgekühlt werden. Eine weitere Kühlung ist aufgrund des kurzen Kontakts der Perfusionslösung mit dem Parenchym nicht möglich. In verschiedenen Studien wurde auch die alleinige topische Kühlung als das bessere Verfahren beschrieben, welches jedoch kaum klinische Anwendung findet (Mayer et al., 1992).

Die ideale Temperatur für die Lagerung der Lunge ist noch nicht endgültig gefunden. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Lungen, die bei 10 °C gelagert wurden, eine bessere Funktion und eine niedrigere W/D-Ratio aufwiesen. Dies scheint auf einen geringen Anteil an aerober Energiegewinnung der Zellen und der damit verbundenen Reduzierung der freien Sauerstoffradikale zurückzuführen zu sein (Shiraishi et al., 1994). Aufgrund der logistischen Vorteile bei der Organentnahme und des Transports wird eine Lagerung in 4 °C kalter Lösung von den meisten Arbeitsgruppen favorisiert.

Auch die Flush-Perfusion mit 4 °C kalter Lösung wird in vielen Arbeiten als nicht mehr adäquat beschrieben. Eine Temperatur zwischen 8-23 °C hat einen größeren protektiven Effekt, der auf eine homogenere Verteilung der Perfusionslösung zurückzuführen ist. Die homogenere Verteilung des Perfusats lässt sich durch die verringerten kälteinduzierten Gefäßspasmen erklären.

#### 2.5.2.2 pH-Wert

In der wenigen Literatur zum optimalen pH-Niveau der Konservierungslösung wurden jeweils mit pH-Werten von ca. 7,4 bis 7,8 die besten Ergebnisse in der Konservierungsqualität erreicht (Hiramatsu et al., 1994; Shiraishi et al., 1994). Auch für die Perfadex-Lösung, die einen pH-Wert von 6,0 besitzt, wird die Anhebung des pH auf einen Wert von 7,4 durch Zugabe von Tris-Puffer empfohlen (Steen et al., 1994b).

#### 2.5.2.3 Perfusionsdruck

In der klinischen Praxis wird heute die pulmonale Flush-Konservierung mit einem Druck von 15-20 mmHg durchgeführt, die in etwa dem pulmonalarteriellen Druck entsprechen. In einer neueren Studie zeigten Sasaki et al., dass ein Perfusionsdruck von 10-15 mmHg eine komplette Perfusion des pulmonalen Gefäßbettes ermöglicht. Sie beobachteten eine signifikant bessere Lungenfunktion nach Reperfusion als nach der Flush-Konservierung mit einem Druck von 5, 20 und 25 mmHg. Ein Perfusionsdruck größer als 20 mmHg führt zu einer signifikant geringeren Produktion von endogenem NO, was einen schädigenden Effekt auf die Lunge zur Folge hat (Sasaki et al., 1996; Tanaka et al., 1998).

#### 2.5.2.4 Inflationszustand der Lunge

Obwohl atelektatische humane Lungen in kalter Ischämie bis zu 5 Stunden konserviert werden können, wird in vielen Arbeiten eine bessere Konservierungsqualität von in Inflation entnommenen Lungen beschrieben (Haverich et al., 1985; Steen et al., 1994a). Die Inflation der Lunge mit Sauerstoff besitzt drei protektive Mechanismen für die Ischämiephase:

1. Aufrechterhaltung eines aeroben Metabolismus
2. Integrität des pulmonalen Surfactants
3. Sicherung des epithelialen Flüssigkeitstransports

In der Ischämiephase sind belüftete Lungen noch in der Lage, Sauerstoff zu verarbeiten und Energie zu produzieren. Durch die aerobe Energiegewinnung wird die Anhäufung zellulärer Metabolite verhindert und der Zelltod hinausgezögert (Date et al., 1993a). Zusätzlich sind die statische Lungencompliance und die Surfactant-

sekretion signifikant besser im Inflations- als im Deflationszustand (DeCampos et al., 1998; Fukuse et al., 1999). In Inflation bleibt der Abtransport von alveolärer Flüssigkeit unabhängig vom Sauerstoffgehalt bestehen, und es kann einem Lungenödem vorgebeugt werden (Sakuma et al., 2000).

Atelektasen sind verbunden mit einem hohen pulmonalen Gefäßwiderstand und einer schlechten Verteilung des Perfusats in der Lunge (Baretti et al., 1995).

Die Hyperinflation der Lunge durch statische Inflation, große Tidalvolumen oder hohen PEEP sollte während der mechanischen Ventilation vermieden werden, da über die gesteigerte Gefäßpermeabilität ein Lungenödem entstehen kann (Haniuda et al., 1996). In neueren experimentellen Studien wird ein Inflationsvolumen von 50 % der totalen Lungenkapazität als optimal beschrieben (DeCampos et al., 1998).

#### 2.5.2.5 Oxygenierung des Beatmungsgases

Der optimale Sauerstoffgehalt des Inspirationsgases ist bisher noch unklar. Sauerstoff ist für die Lagerung des Organs wichtig, um den aeroben Stoffwechsel zu ermöglichen (Weder et al., 1991; Date et al., 1993a). Jedoch wird ein Sauerstoffgehalt von größer als 50 % als zytotoxisch angesehen, da er die Lipidperoxidation während der Lagerung verstärkt und ein pulmonales Ödem hervorrufen kann (Fisher et al., 1991; Kayano et al., 1999a).

Deshalb wird für die klinische Praxis eine Ventilation mit einer  $F_{iO_2} \leq 0,5$  empfohlen.

## **2.6 Methoden der klinischen Lungenkonservierung**

In der klinischen Praxis haben sich vier unterschiedliche Methoden der Lungenkonservierung nacheinander abgelöst.

Zuerst entwickelte Martin Anfang des letzten Jahrhunderts die normotherme Auto-perfusion eines arbeitenden Herz-Lungenblocks. Die für physiologische Studien verwandte Technik wurde in den sechziger Jahren für die klinische Lungentransplantation übernommen. Mit der in Pittsburgh/USA praktizierten Methode konnten Ischämiezeiten von 4-6 Stunden erreicht werden. Jedoch war die starke pulmonale Hypertension nicht in den Griff zu bekommen (Kirk et al., 1993).

Das zweite Verfahren ist die topische Organkühlung durch Immersion in das Konservierungsmedium. Diese Methode wurde in den achtziger Jahren von der Arbeitsgruppe in Toronto/Kanada entwickelt und wurde bei den ersten Einzellungen-Transplantationen mit Langzeiterfolg durchgeführt. Der Nachteil lag jedoch in der zu kurzen Ischämiedauer (Toronto Transplant Group, 1986; Kirk et al., 1993).

Eine weitere Methode stellt das „Donor Core-Cooling“ mit kardiopulmonalem Bypass dar. Bei dieser Technik wird der Organspender mittels Herz-Lungenmaschine und Wärmeaustauscher auf ca. 10 °C abgekühlt. Das vor allem in Harefield/GB eingesetzte Konservierungsverfahren konnte sich aufgrund des hohen technischen Aufwands und der Lungenschädigung durch die extrakorporale Zirkulation klinisch nicht durchsetzen (Yacoub et al., 1989; Kirk et al., 1993).

Die Single-Flush-Perfusion mit kalter EC-Lösung über die Pulmonalarterie mit anschließender hypothermer Lagerung in einem Perfusionsmedium wird heute als Standardmethode zur Lungenkonservierung angesehen. Diese Methode wurde in Stanford/USA etabliert und anschließend von ca. 80 % der Transplantationszentren übernommen. Das erfolgreiche Verfahren überzeugt besonders durch die leichte technische Durchführbarkeit und die schnelle, effektive Lungenkühlung (Haverich et al., 1986; Grover et al., 1997; Conte & Baumgartner, 2000).

Eine Weiterentwicklung der Single-Flushperfusion stellte die retrograde Flushperfusion dar, bei der die Perfusion über das linke Atrium erfolgt. Neben der Perfusion der Pulmonalstrombahn werden auch die Bronchialarterien konserviert. Durch die Flushkonservierung, die in umgekehrter Richtung zum physiologischen Blutstrom erfolgt, werden intravasal gebildete Thromben ausgespült. Trotz guter Ergebnisse in Klinik und Forschung konnte sich diese Methode international noch nicht etablieren (Alvarez et al., 1999; Wittwer et al., 2000).

## **2.7 Experimentelle Modelle**

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Modellen zur experimentellen Untersuchung verschiedener Aspekte der Lungenkonservierung entwickelt (Kirk et al., 1993). Hierbei spielen Tiermodelle die wichtigste Rolle. Die Verwendung verschiedener Spezies macht es jedoch kompliziert, die Daten verschiedener Arbeitsgruppe miteinander zu vergleichen und zu reproduzieren. Die heute gängigsten Methoden lassen sich unterteilen in *in-vitro* Modelle [isolierten Zellverbänden] und tierexperimentelle Modelle [extrakorporale Kreisläufe] sowie in *in-vivo* Modelle.

### **2.7.1 In-vitro Modelle**

*In-vitro* Modelle sind besonders für grundlegende pathophysiologische Fragestellungen interessant, die an isolierten Zellkulturen oder Zellverbänden untersucht werden. Es können genauere Erkenntnisse über zelluläre und molekulare Mechanismen während der unterschiedlichen Phasen der Lungenkonservierung gewonnen werden. Der Schwerpunkt liegt vor allem in der Erforschung des Gefäßendothels beispielsweise zur Frage der Gefäßkontraktilität und -relaxation (Ingemansson et al., 1995). *In-vitro* Modelle werden weiterhin zur Untersuchung spezieller Grundlagen der Lungenkonservierung eingesetzt. Sie sind jedoch nicht in der Lage, für die Klinik relevante, funktionelle Untersuchungen zu ermöglichen. Während viele der verwendeten Methoden [speziell in der Zellkultur] einen hohen Aufwand erfordern, haben sie den großen Vorteil, dass nicht zwingend Tiere getötet werden müssen.

### **2.7.2 Ex-vivo Modelle**

Die auch als extrakorporale Modelle bezeichneten Tiermodelle spielen in der Konservierungsforschung als kostengünstige Screeningverfahren eine große Rolle (Wang et al., 1989; Kirk et al., 1993). Kleintiere wie Ratten und Kaninchen werden für die extrakorporalen Modelle bevorzugt genutzt. Es sind sowohl Untersuchungen an Herz-Lungenmodellen mit erhaltener Herzfunktion als auch an isoliert perfundierten Lungenmodellen realisierbar. Bei isolierten Lungenmodellen wird die Herzfunktion durch hydrostatische Perfusion oder mittels einer Rollerpumpe ersetzt (Semik et al.,



1987; Uhlig & Wollin, 1994). Ein Vorteil des extrakorporalen Kreislaufs besteht in der Konstanthaltung einiger Parameter wie der Perfusionsrate, während die Variation der zu untersuchenden Variablen beobachtet wird. Außerdem können humorale Faktoren ausgeschaltet und der Einfluss der Konservierung isoliert beurteilt werden. Ein Nachteil der Methode ist der aufgrund der Instabilität der Systeme auf ca. 2 Stunden limitierte Beobachtungszeitraum.

### **2.7.3 In-vivo Modelle**

*In-vivo* Modelle erfordern einen hohen technischen Aufwand, da nach der pulmonalen Konservierung die Transplantation des Organs auf ein Empfängertier erfolgt. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt wie z. B. die heterotope Transplantation einzelner Lungenflügel an Kleintiermodellen oder die temporäre Ausschaltung einer Lungenhälfte von der Zirkulation (Kayano et al., 1999b; Strüber et al., 2000). Der Forschungsschwerpunkt liegt jedoch auf der orthotopen Transplantation eines Spenderorgans auf ein Empfängertier. Dies entspricht am ehesten der klinischen Praxis am Menschen (Kirk et al., 1993). Die Vorteile der *in-vivo* Versuche liegen in der längeren Nachbeobachtungszeit und der Möglichkeit, chronische Versuche durchzuführen, d. h. den Beobachtungszeitraum auf mehrere Tage auszudehnen (Jones et al., 1988; Haverich et al., 1991). Außerdem lassen sich Abstoßungsreaktionen und humorale Einflüsse des Organempfängers untersuchen. Durch histologische Analysen lassen sich Aussagen über strukturelle Veränderungen der transplantierten Lunge treffen.

### **2.7.4 Großtiermodelle**

Kleintiere wie Ratten und Kaninchen weisen erhebliche genetische Unterschiede zum Menschen auf, weshalb die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen kritisch zu beurteilen ist (Kirk et al., 1993). Großtiere sind dem Menschen ähnlicher und die Forschungsergebnisse sind in der klinischen Praxis besser reproduzierbar. In der pulmonalen Transplantationsforschung mit Großtieren wird das Schwein von vielen Arbeitsgruppen bevorzugt (Hughes, 1986). Dies resultiert aus der Anatomie des kardiopulmonalen Systems des Schweins, welche der des Menschen ähnelt. Zusätzlich sind die Kosten für Zucht und Haltung im Vergleich zu anderen Großtieren niedriger.

## 2.8 Ziele der Arbeit

In der vorgelegten tierexperimentellen Arbeit wurde an einem *in-vivo* Transplantationsmodell am Schwein untersucht, ob die modernen extrazellulären Lösungen Celsior und Perfadex hinsichtlich der Konservierungsqualität miteinander vergleichbar sind.

Die EC-Lösung, die bisher den internationalen Standard der Lungenkonservierung repräsentiert, kann aufgrund internationaler Forschungsergebnisse im Vergleich zu modernen Lösungen hinsichtlich der Konservierungsqualität als suboptimal eingestuft werden. Hingegen wird die Perfadex-Lösung in der Literatur im Vergleich zur EC-Lösung als überlegen beschrieben und bereits in der klinischen Lungentransplantation erfolgreich eingesetzt [s. Kapitel 2.5.1]. Auch die Celsior-Lösung, die sich schon für Herztransplantate bewährt hat, scheint aufgrund vieler theoretischer Vorteile ihrer Komponenten [s. Kapitel 2.5.1] für die Lungenkonservierung besonders geeignet zu sein. Die Lösungen Perfadex und Celsior erzielten in einem extrakorporalen Screeningmodell mit Ischämiezeiten von 4 Stunden vergleichbare qualitative Ergebnisse (Wittwer et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob sich die Ergebnisse des extrakorporalen Kleintiermodells auf ein *in-vivo* Modell übertragen lassen. Die Ischämiezeit wurde auf 27 Stunden ausgedehnt.

### **3. Material und Methodik**

Für die Untersuchung wurde ein *in-vivo* Schweinemodell gewählt. Hierzu wurden die Lungen unter entsprechenden Bedingungen mittels Flush über die Pulmonalarterie konserviert. Nach einer definierten kalten Ischämiezeit bei 4 °C erfolgte die Transplantation der linken Einzellunge in ein Empfängertier. Um die Funktion der transplantierten Lunge isoliert beurteilen zu können, wurde nach der Reperfusion die rechte Lunge des Empfängers sowohl aus dem Kreislauf als auch aus der Ventilation ausgeklemmt. Im anschließenden sechsstündigen Beobachtungszeitraum wurden die Hämodynamik, die respiratorischen und Oxygenierungsparameter der Lunge evaluiert sowie Serum und EDTA-Plasma zur Konzentrationsbestimmung von Malondialdehyd und Endothelin-1 entnommen. Nach Versuchsende erfolgte die Entnahme von Gewebeproben zur histologischen Bestimmung der Granulozyteneinwanderung in die Alveolen.

#### **3.1 Versuchstiere**

Die Durchführung der Studie erfolgte an weiblichen Hausschweinen [Deutsche Landrasse, Charles River, Sulzfeld] von ca. 30 Kilogramm. Die Tiere stammten aus einer landwirtschaftlichen, kontrollierten Zuchtlinie, die nach den international anerkannten Empfehlungen der Federation of European Laboratory Animal für Versuchstiere in der biomedizinischen Forschung geführt wird (FELASA, 1998).

Die Tiere standen unter tierärztlicher Aufsicht des Instituts für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Der Umgang mit den Tieren erfolgte nach den Richtlinien der National Society for Medical Research und der National Academy of Science [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication No.86-23, revidiert 1985].

## 3.2 Versuchsgruppen

Zur Durchführung der Studie wurden die Tiere randomisiert drei Versuchsgruppen zugeteilt. Während die Gruppe I aus 5 Tieren bestand, wurden den Gruppen II und III je 5 Spender- und Empfängertieren zugelost:

Gruppe I	Sham-Operation ohne Konservierung, Ischämie und Transplantation
Gruppe II	Perfadex-Konservierung, kalte Ischämiezeit 27 Stunden
Gruppe III	Celsior-Konservierung, kalte Ischämiezeit 27 Stunden

## 3.3 Versuchsdurchführung

### 3.3.1 Anästhesie

Zur Narkoseeinleitung wurde den Tieren Ketamin 20 mg/kgKG [Ketamin 10%, Atarost, Twistingen, Deutschland] zusammen mit 150 IE Hylase [Hylase-Dessau, PharmDessau, Dessau, Deutschland] intramuskulär in den Ohrgrund verabreicht. Anschließend wurden die Tiere gewaschen und gewogen.

Zur Prämedikation wurde den Schweinen Atropin 0,04 mg/kgKG [Atropin-Sulfat Braun 0,5 mg, B. Braun, Melsungen, Deutschland] intramuskulär in den Oberschenkel injiziert. Über den Gefäßzugang [Braunüle, B. Braun, Melsungen, Deutschland] in der Vena auricularis caudalis des linken Ohrs wurde eine Injektionsnarkose mit Propofol 2-4 mg/kgKG [Disoprivan 2 % Emulsion, AstraZeneca, Wedel, Deutschland] eingeleitet.

Nach der orotrachealen Intubation erfolgte die druckkontrollierte Beatmung [Evita 2 dura, Dräger, Lübeck, Deutschland] mit den folgenden Basisparametern:

- Atemfrequenz 25 min<sup>-1</sup>
- Inspiration/Expiration 1:1
- F<sub>i</sub>O<sub>2</sub> 0,5
- Inspiratorischer Spitzendruck max. 20 mmHg
- PEEP 8 mmHg

Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit einer intravenösen Dauerinfusion folgender Substanzen:

- Fentanyl 0,2-0,4 µg/kgKG/min [Fentanyl, Janssen, Neuss, Deutschland]
- Midazolam 16-20 µg/kgKG/min [Midazolam, Ratiopharm, Ulm, Deutschland]
- Pancuroniumbromid 6-10 µg/kgKG/min [Pancuronium duplex, Curamed, Karlsruhe, Deutschland]

### **3.3.2 Operatives Vorgehen**

Bei den Spender- und Empfängertieren erfolgte zuerst die Präparation der rechten V. jugularis externa in Rückenlage. In das präparierte Gefäß wurde eine Gefäßschleuse [Perkutanes Kanülenbesteck 8 F, Edwards Lifesciences, Unterschleißheim, Deutschland] gelegt, durch die anschließend ein Pulmonalkatheter [Swan-Ganz CCO/VIP 139HF75 7,5 F, Edwards Lifesciences, Unterschleißheim, Deutschland] eingeschwenkt wurde. Danach wurde die linke A. carotis interna dargestellt und ein Druckmesskatheter [Leader Cath 20G 8cm, Vygon, Ecouen, Frankreich] zur arteriellen Blutdruckmessung eingeführt.

#### **3.3.2.1 Präparation des Spendertiers**

Beim Spendertier erfolgten in Rückenlage die mediane Sternotomie mit der oszillierenden Säge sowie die Perikardiotomie. Anschließend wurde die Aorta vom Truncus pulmonalis getrennt und die beiden Hohlvenen präpariert. Zur Kanülierung des Truncus pulmonalis wurde an dessen proximalem Ende eine 5-0 Prolene-Tabaksbeutelnaht vorgelegt, durch die die Kanülierung mittels Perfusionskanüle [arterielle Kanüle 16F, Medtronic, Düsseldorf, Deutschland] der Pulmonalarterie erfolgte. Die Kanüle wurde luftfrei mit der Konservierungslösung konnektiert und zur Messung des Flushdrucks mit einem Druckabnehmer verbunden. Als nächster Schritt wurde der linke Vorhof eröffnet, um ein Abfließen der Konservierungslösung zu ermöglichen. Nach Klemmung von Pulmonalarterie und anschließend der Aorta erfolgte die Inzision der V. cava inferior und superior zur Gewinnung von Vollblutkonserven unter Einsatz eines Cell-Saver-Saugers [Blood Stream Recovery

System, Harvest Technologies, Plymouth, USA]. Nach dem Ausbluten wurden die Lungen mit 2 Litern der jeweiligen Konservierungslösung [Perfadex oder Celsior] aus 30 cm Höhe perfundiert. Während der Perfusion wurden sowohl der Flushdruck als auch die Flushzeit gemessen. Anschließend wurde die Kanüle entfernt und die Aorta und V. cava superior abgesetzt. Nach Präparation und Klemmen der Trachea in Inspiration [Inflationsdruck 20 mmHg] wurden die Aorta und der Truncus pulmonalis getrennt und der Herz-Lungen-Block entnommen. Das explantierte Organpaket wurde in einem luftleeren Organbeutel mit einem Liter Konservierungslösung verpackt und bei 4 °C gelagert. Die Gesamtschämiezeit betrug 27 Stunden.

#### 3.3.2.2 Empfängeroperation

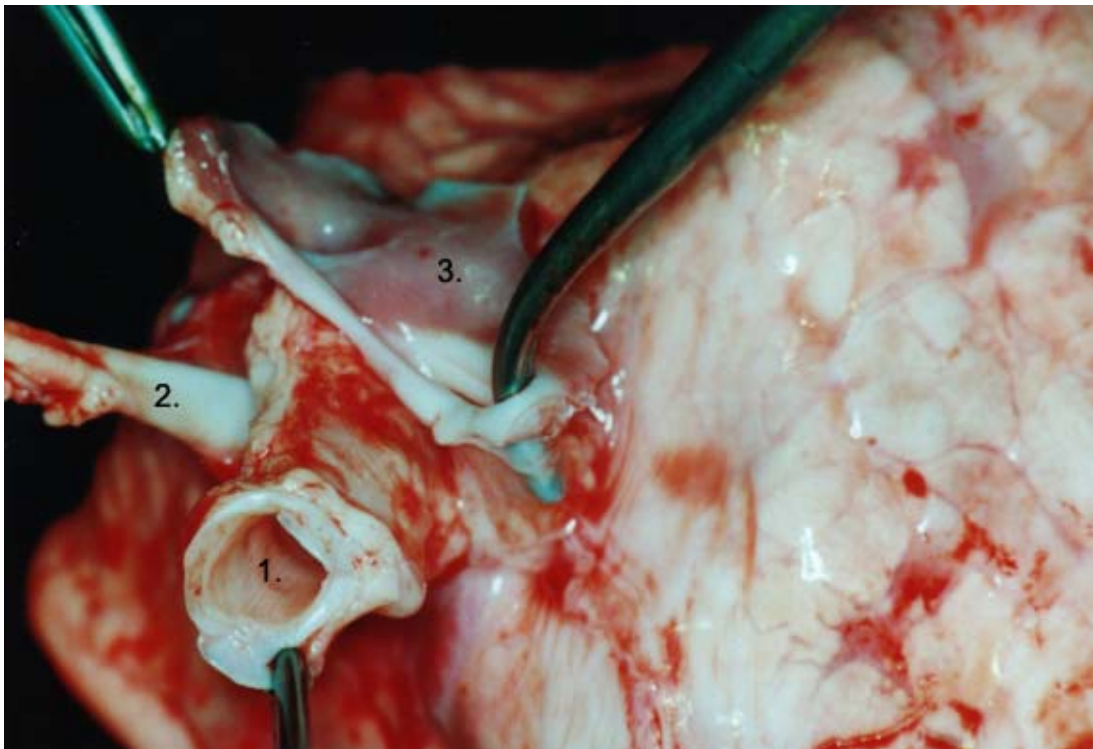
Nach der Präparation und Kanülierung der Halsgefäße [s. Kapitel 2.3.4] wurden die Tiere in Rechtsseitenlage umgelagert. Vor der Pneumonektomie wurden dem Tier 250 mg Methylprednisolon [Urbason, Hoechst, Frankfurt, Deutschland] intravenös injiziert. Der Hautschnitt zur linkslateralen Thorakotomie erfolgte parallel zu den Rippen auf Höhe des Angulus inferior der Scapula im 5. Interkostalraum. Nach Durchtrennung des Musculus latissimus dorsi und Musculus serratus anterior bis auf die Fascia der Musculi intercostalis externi wurden die Musculi intercostalis externi und interni am Oberrand der Rippen vier und fünf mitsamt der Pleura vorsichtig entfernt. Das Caput costae dieser beiden Rippen wurde ebenfalls durchtrennt, um den Rippenspreizer einzusetzen und den Thorax zu eröffnen.

Nach der Durchtrennung des Ligamentum pulmonale wurde die Vena hemiazygos freipräpariert und ligiert. Darauf folgend wurden die Nodi lymphatici tracheobronchiales exstirpiert, die beim Schwein recht prominent und stark arterialisiert sind. Anschließend wurde die rechte und linke A. pulmonalis präpariert und der rechte Hauptbronchus für die spätere Ausklemmung dargestellt. Zwischen oberer und unterer Lungenvene auf Höhe des N. phrenicus wurde das Perikard eröffnet und nach Anlage einer 5-0 Prolene-Tabaksbeutelnaht ein Katheter [LAP1251, 3,6 F, Jostra Medizintechnik, Hirrlingen, Deutschland] zur Messung des linksatrialen Drucks in den linken Vorhof eingebracht.

Ausschließlich in der Sham-Kontrollgruppe erfolgte nach Präparation des Lungenhilus direkt die Ausklemmung der Kontralateralseite [s. Kapitel 3.3.2.4].

### 3.3.2.3 Präparation des Organpaketes

Zur Vorbereitung auf die Implantation wurde die linke Lunge am konservierten Herz-Lungenblock des Spenders präpariert. Hierzu wurde die Pleura und das Vorhofseptum durchtrennt und der Vorhofcuff unter Einbeziehung der Mündungen der Venen der rechten Lunge zugeschnitten. Nach Präparation und Abtrennung der linken A. pulmonalis direkt am Truncus pulmonalis erfolgte die Abtrennung des linken Hauptbronchus direkt an der Trachea [Abbildung 2].

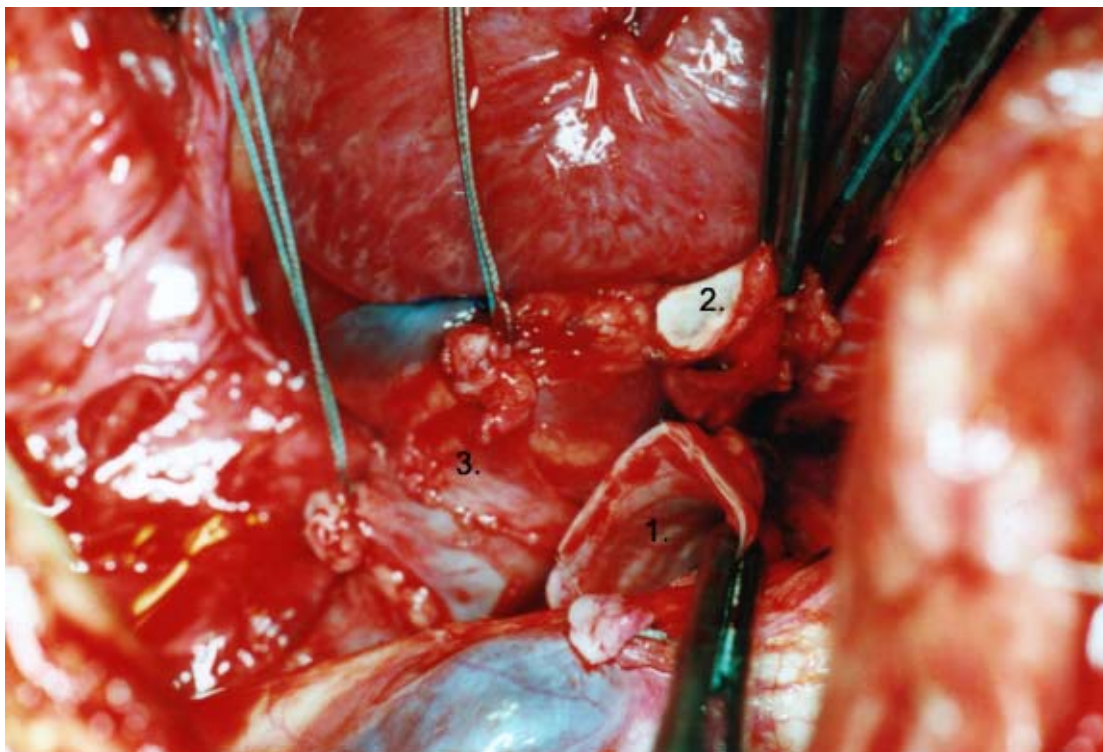


**Abbildung 2:** Lungenblock Spendertier; 1. Hauptbronchus, 2. A. pulmonalis, 3. Vorhofmanschette

#### 3.3.2.4 Implantation der Lunge

Im Anschluss an die Klemmung der linken A. pulmonalis wurden die linken Lungenvenen ligiert und durchtrennt. Nach der Klemmung des linken Hauptbronchus konnte dieser abgesetzt und die Lunge entnommen werden [Abbildung 3].

Nach dem Zurechtschneiden der Hauptbronchien wurden diese mit einer fortlaufenden 4-0 Prolene-Naht anastomosiert. Anschließend begann die warme Ischämiephase mit der Anastomosierung der Pulmonalarterien. Diese erfolgte unter Vermeidung von Spannung mittels einer fortlaufenden 6-0 Prolene-Naht. Im Anschluss an die Ausklemmung und Längsinzision des linken Vorhofs wurden die beiden Vorhofmanschetten mittels fortlaufender 5-0 Prolene-Naht anastomosiert.



**Abbildung 3:** Empfängersitus; 1. Hauptbronchus, 2. A. pulmonalis, 3. Vorhofmanschette



Durch die Öffnung der atrialen Gefäßklemme wurden die Gefäßanastomosen retrograd entlüftet. Unter Ventilation mit einem PEEP von 10 mmHg wurde die Reperfusion freigegeben. In der initialen Reperfusionsphase wurde eine inotrope Therapie mittels eines Adrenalin-Perfusors [Suprarenin 1:1000, Hoechst, Frankfurt, Deutschland, Konzentration: 1 mg/50 ml] mit einer Laufrate von 3-5 ml/h eingeleitet. Anschließend erfolgte die Klemmung der kontralateralen Pulmonalarterie und Hauptbronchus, sodass ausschließlich die transplantierte Lunge die komplette Funktion des Organs übernahm. Das Tier wurde anschließend über 6 Stunden nachbeobachtet, um die Funktion des transplantierten Organs zu beurteilen.

### 3.3.5 Funktionelle Parameter

#### 3.3.5.1 Spendertier

Es wurden einmalig Basisparameter zur hämodynamischen und respiratorischen Funktion sowie Parameter des Gasaustausches erhoben.

Zuerst wurden Gewicht, Temperatur und Herzfrequenz [HF] bestimmt. Die invasive Hämodynamik [systemische Blutdruckwerte, zentralvenöser Druck (ZVD), pulmonalarterieller Druck (PAP), pulmonalkapillärer Verschlussdruck (PCWP)] wurde auf einem Druckmonitor [Virida 24 CT, Hewlett-Packard, Deutschland] dargestellt. Die kontinuierliche Messung des Herzzeitvolumen [HZV] sowie die Berechnungen der abgeleiteten Größen systemischer [SVR] und pulmonalvaskulärer Widerstand [PVR] [s. Gleichung 1] erfolgten mit einem HZV-Monitor [Vigilance VG2, Baxter, München-Unterschleißheim, Deutschland].

$$PVR = \frac{(mPAP - LAP)}{HZV} \cdot 80$$

**Gleichung 1: Pulmonalvaskulärer Widerstand PVR [dyne \* s \* cm<sup>-5</sup>];** mPAP: mittlerer pulmonalarterieller Druck [mmHg]; LAP: linksatrialer Druck [mmHg]; HZV: Herz-Zeit-Volumen [ml/min]

Zur maschinellen Beatmung kam ein Beatmungsgerät [Evita 2 dura, Dräger Medical, Deutschland] zum Einsatz. Von der Beatmungsmaschine wurden das Atemminutenvolumen, das Tidalvolumen und die dynamische Compliance [C] gemessen und die

vorgewählten respiratorischen Parameter pulmonalinspiratorischer Spitzendruck, Atemfrequenz sowie der positiv-endexpiratorische Druck [PEEP] angezeigt.

Zur Gewinnung der Parameter des Gasaustausches wurden mittels heparinierter Spritzen arterielle [aus der A. carotis communis] und gemischtvenöse [aus der Pulmonalarterie] Blutproben entnommen und mit dem Blutgasanalysegerät [ABL 715-B, Radiometer Copenhagen, Willich-Schiefbahn, Deutschland] untersucht.

Für die Beurteilung der Gasaustauschfunktion der Lunge wurde der OxygenierungsindeX unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen  $[p_aO_2/F_iO_2]$  auf Basis des  $p_aO_2$  berechnet.

#### 3.3.5.2 Empfängertier

Bei den Empfängertieren wurden die in Kapitel 3.3.5.1 beschriebenen Basisparameter als Ausgangswert direkt vor Klemmung der Empfänger-Pulmonalarterie gemessen. Zusätzlich wurde der Wert des direkt abgeleiteten linksatrialen Drucks erhoben. Nach Reperfusion der transplantierten Lunge erfolgte eine weitere Messung der Parameter. Im weiteren Versuchsablauf wurden alle Parameter während der sechsstündigen Beobachtungsphase im Intervall von 30 Minuten gemessen. Am Ende des Versuches wurden aus Ober- und Unterlappen jeweils ca. 8 cm<sup>3</sup> große Gewebeproben entnommen und auf einer Präzisionswaage [S 300, Sartorius, Göttingen, Deutschland] das Feuchtgewicht bestimmt. Anschließend wurden die Lungenproben für 48 Stunden bei 60 °C in einem Wärmeschrank getrocknet und das Trockengewicht gemessen. Aus dem Feucht- und Trockengewicht wurde die Wet/Dry-Ratio [W/D-Ratio] berechnet.

#### **3.3.6 Serologische Parameter**

Während des Versuchs wurden als Basiswert Blutproben für die Konzentrationsbestimmung von Malondialdehyd und Endothelin-1 zu Beginn des Messzeitraums, nach 2,5 Stunden sowie nach 5 Stunden entnommen.

#### 3.3.6.1 Malondialdehyd

Die Blutprobe zur Quantifizierung von Malondialdehyd wurde mittels eisgekühlter Serum-Monovette [S-Monovette 10 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland] aus dem linksatrialen Katheter entnommen. Das frisch abgenommene Serum wurde sofort auf Eis gestellt und anschließend bei 4 °C mit 4000 Umdrehungen/min für 10 Minuten zentrifugiert [Megafuge 1.0 RS, Heraeus, Hanau, Deutschland]. Danach wurden die Überstände in sterile Eppendorf-Röhrchen pipettiert und bei -30 °C gelagert. Die Quantifizierung erfolgte im Labor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Friedrich-Schiller Universität Jena [Direktor: Prof. Dr. Deufel]. Die Bestimmung von Malondialdehyd im Serum wurde nach der Methode von Yagi (Yagi, 1982) durchgeführt. Die Methode basiert auf der Kondensation von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure zu einer fluoreszierenden Verbindung, die mit n-Butanol extrahiert und am Fluorometer LS 30 [Perkin-Elmer] vermessen wird. In Zentrifugenröhrchen wurden 0,2 ml Dodexylsulfatlösung, 1,5 ml Thiobarbitursäurelösung [0,8%] und 1,5 ml Trichloressigsäurelösung [10 %] pipettiert und dazu unter Schütteln 0,1 ml Serum bzw. Malondialdehyd-Bezugslösung als Eichkurve gegeben. Es wurden Doppelbestimmungen angesetzt. Das Gemisch wurde 25 Minuten bei 95 °C erhitzt und nach der Abkühlung mit 5 ml Butanol-Salzsäure-Gemisch versetzt und für 20 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 7 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde am Fluorometer LS 30 bei 553 nm mit Exzitation bei 515 nm durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte nach dem gleichen Verfahren mit Malondialdehydkonzentrationen von 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 µmol/l.

Der Referenzbereich für Malondialdehyd im Serum liegt bei 1,6-2,4 µmol/l.

#### 3.3.6.2 Endothelin-1

Die Blutprobe zur Quantifizierung von Endothelin-1 wurde mittels eisgekühlter EDTA-Monovette [S-Monovette 10 ml, Sarstedt, Deutschland] aus dem LA-Katheter entnommen. Das frisch abgenommene EDTA-Plasma wurde sofort auf Eis gestellt und anschließend bei 4 °C mit 4000 Umdrehungen/min für 10 Minuten zentrifugiert [Megafuge 1.0 RS, Heraeus, Deutschland]. Danach wurden die Überstände in sterile Eppendorf-Röhrchen pipettiert und bei -30 °C gelagert. Die Messung von Endothelin-1 erfolgte im Immunchemischen Labor des Instituts für Klinische Chemie und

Laboratoriumsdiagnostik der Friedrich-Schiller Universität Jena. Es wurde eine Fällung mit 1 ml der Probe und 1,5 ml Fällungsreagenz [Aceton und PAA] durchgeführt, um mögliche Interferenzen von verschiedenen Matrices zu minimieren. Nach Abkühlen auf 4 °C und anschließendem Zentrifugieren wurde der Überstand in PP-Röhrchen dekantiert und in einer Speedvac zur Trocknung eingengt. Die getrockneten Proben wurden in 500 µl Assaypuffer aufgelöst. Bei der Durchführung des ELISA wurden alle Werte doppelt bestimmt. Der für Endothelin-1 spezifische Sandwich-ELISA verwendet einen auf Mikrotiterplatten beschichteten immunaffinitätschromatographisch gereinigten polyklonalen Erstantikörper. Ein für Endothelin hochspezifischer monoklonaler Detektionsantikörper wurde gleichzeitig mit der Probe zugegeben und bildet mit dem in der Probe vorhandenen Endothelin und dem gebundenen Erstantikörper ein Sandwich. Nach einem Waschschrift, der alle nicht spezifischen gebundenen Substanzen entfernt, wurde die Menge an gebundenen monoklonalen Antikörpern bestimmt. Sie entspricht der Menge des in der Probe enthaltenen Endothelins. In diesem Schritt wird ein mit Peroxidase konjugierter anti-Maus Antikörper eingesetzt. Nach mehrmaligem Waschen wird Tetramethylbenzidin [TMB] als Substrat zugegeben.

Die in einem ELISA-Photometer messbare Farbentwicklung ist direkt proportional zu der Konzentration an Endothelin in der Probe. Der laborspezifische Referenzbereich für Endothelin-1 im Plasma beträgt 0,2-0,7 fmol/ml.

### **3.3.7 Morphologische Parameter**

Zur histologischen Analyse der Leukozyteninfiltration in das Lungengewebe wurden Gewebeproben aus Ober- und Unterlappen sowie aus der Lingula entnommen und in einer 4-%-igen Formalinlösung fixiert. Die histologische Beurteilung erfolgte im Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller Universität Jena [Direktor: Prof. Dr. Katenkamp]. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet und in 4 µm große Schichten geschnitten. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin und Naphtol-AS-D-Chloroacetat-Esterase gefärbt. Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten [PMN] wurden anhand ihrer Morphologie und einer positiven Esterasefärbung identifiziert. Die Zählung der PMN und der Alveolen erfolgte in vier verschiedenen Gesichtsfeldern unter 400-facher Vergrößerung. Die gemittelten Daten wurden als PMN/Alveolus beschrieben. Die Messung der Proben erfolgte durch dieselbe Person ohne Kenntnis über die Versuchsgruppen und deren funktionellen Ergebnisse.

### **3.4 Statistische Methodik**

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programms SPSS [SPSS für Windows, Version 10.0, Birmingham, USA]. Die Analyse wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Friedrich-Schiller Universität [Direktor: Prof. Dr. Witte] mit großer Unterstützung von Herrn Dr. Volland durchgeführt. Die Auswertung aller Parameter, die über den Messzeitraum wiederholt erhoben wurden und die Voraussetzung der Normalverteilung erfüllten, erfolgte mit einer univariaten ANOVA-Analyse mit Messwiederholungen. Die einmalig erhobenen Parameter wie Wet/Dry-Ratio und PMN/Alveolus wurden mittels einfaktorieller ANOVA-Analyse ausgewertet. Zum Vergleich der Gruppen untereinander erfolgte eine Post-hoc Analyse. Ergab die Prüfung mittels Levene-Test, dass die Variablen varianzhomogen verteilt waren [ $p > 0,05$ ], wurde die Post-hoc Analyse mittels LSD-Test angewendet. Bei Varianzheterogenität [Levene-Test:  $p \leq 0,05$ ] erfolgte die Post-hoc Analyse mit dem Tamhane-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Spendertiere

#### 4.1.2 Körpergewicht

Die Spendertiere hatten ein mittleres Gewicht von  $27,9 \pm 4,9$  Kilogramm. Das Körpergewicht der Tiere war in den Gruppen untereinander vergleichbar und ergab keinen signifikanten Unterschied [Tabelle 2].

**Tabelle 2:** Spender- und Empfängergerichte [kg]

Gewicht [kg]	Sham	Perfadex	Celsior
Spender	entfällt	$31,3 \pm 1,8$	$24,4 \pm 6,9$
Empfänger	$26,8 \pm 5,9$	$34,5 \pm 2,2$	$25,8 \pm 6,9$

Gruppenvergleich	Signifikanzniveau (p) Spender	Signifikanzniveau (p) Empfänger
Sham-Perfadex	entfällt	<b>0,046*</b>
Sham-Celsior	entfällt	0,777
Perfadex-Celsior	0,064	<b>0,027*</b>

Gruppenvergleich mittels ANOVA post-hoc Test [LSD]

#### 4.1.3 Hämodynamische Parameter

Im Vergleich der hämodynamischen Parameter ergaben sich keine gruppenspezifischen Unterschiede. Als charakteristische Parameter wurden das Herzzeitvolumen, der pulmonalvaskuläre Widerstand sowie der mittlere arterielle Blutdruck gewählt [Tabelle 3; 4, 5]. Das Herzzeitvolumen betrug im Mittel  $3,1 \pm 0,5$  ml/min, der pulmonalvaskuläre Widerstand  $263,4 \pm 132,7$  dyne\*s\*cm<sup>-5</sup> und der mittlere arterielle Blutdruck  $88,0 \pm 26,0$  mmHg.

**Tabelle 3: HZV der Spendertiere**

	<b>Sham</b>	<b>Perfadex</b>	<b>Celsior</b>
<b>HZV [l/min]</b>	entfällt	3,36±0,44	2,82±0,50

<b>Gruppenvergleich</b>	<b>Signifikanzniveau (p)</b>
Perfadex-Celsior	0,106

Gruppenvergleich mittels einfaktorieller ANOVA; HZV: Herzzeitvolumen

**Tabelle 4: Pulmonalvaskulärer Widerstand [PVR] der Spendertiere**

	<b>Sham</b>	<b>Perfadex</b>	<b>Celsior</b>
<b>PVR [dyne*s*cm<sup>-5</sup>]</b>	entfällt	217,8±111,8	309,0±148,9

<b>Gruppenvergleich</b>	<b>Signifikanzniveau (p)</b>
Perfadex-Celsior	0,304

Gruppenvergleich mittels einfaktorieller ANOVA; PVR: pulmonalvaskulärer Widerstand

**Tabelle 5: MAP der Spendertiere**

	<b>Sham</b>	<b>Perfadex</b>	<b>Celsior</b>
<b>MAP (mmHg)</b>	entfällt	87,6±17,7	88,4±34,7

<b>Gruppenvergleich</b>	<b>Signifikanzniveau (p)</b>
Perfadex-Celsior	0,965

Gruppenvergleich mittels einfaktorieller ANOVA; MAP: mittlerer arterieller Blutdruck

#### 4.1.4 Oxygenierung

Alle Spendertiere wiesen eine vergleichbare Oxygenierung auf. Der arterielle Sauerstoffpartialdruck [p<sub>a</sub>O<sub>2</sub>] lag im Mittel bei 246,9±102,8 mmHg [Tabelle 6].

**Tabelle 6: Arterieller Sauerstoffpartialdruck der Spendertiere**

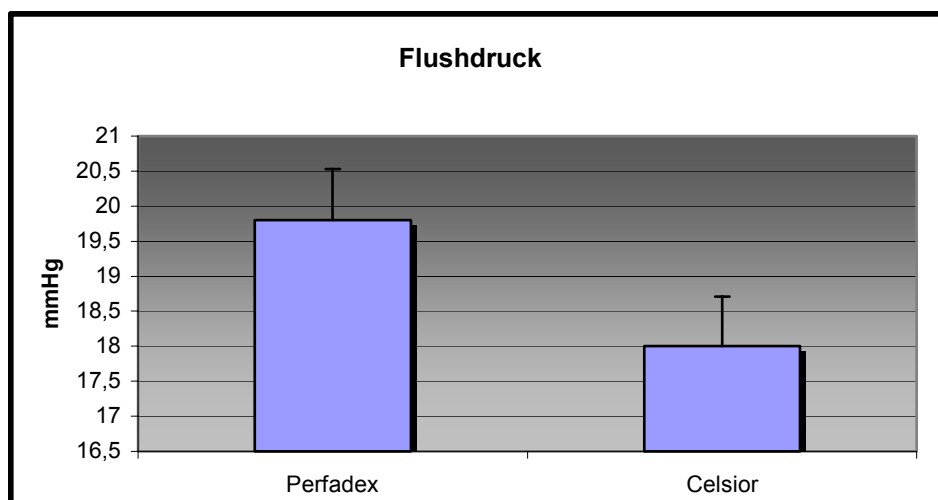
	Sham	Perfadex	Celsior
$p_aO_2$ [mmHg]	entfällt	210,8±110,8	309,0±148,9

Gruppenvergleich	Signifikanzniveau (p)
Perfadex-Celsior	0,292

Gruppenvergleich mittels einfaktorieller ANOVA;  $p_aO_2$ : arterieller Sauerstoffpartialdruck

## 4.2 Flushdruck

Der Flush-Perfusionsdruck zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen Perfadex und Celsior auf. Die standardisierte Methode der Flushperfusion ergab im Mittel einen Perfusionsdruck von 18,9±1,8 mmHg [Abbildung 4, Tabelle 7].



**Abbildung 4: Flushdruck**

Gruppenvergleich mittels einfaktorieller ANOVA

Signifikanz: keine

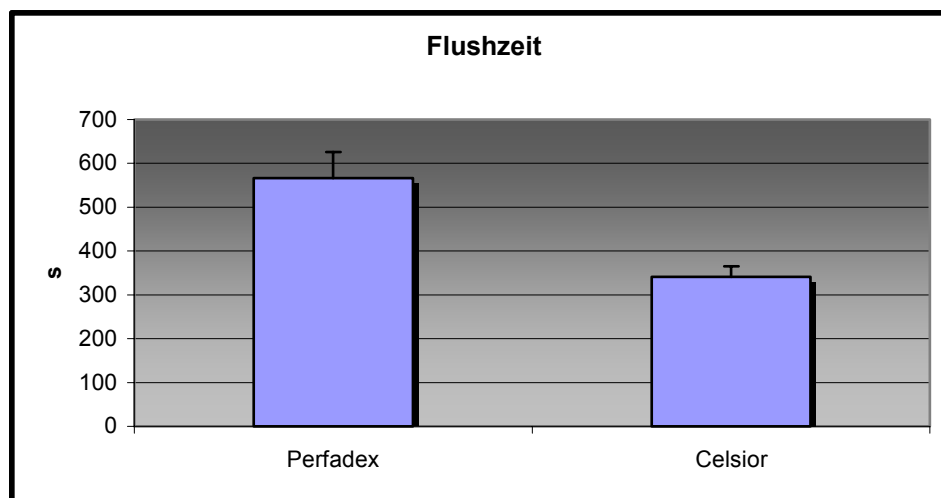
**Tabelle 7: Flushdruck**

	Sham	Perfadex	Celsior
Flushdruck [mmHg]	entfällt	19,8±1,6	18,0±1,6



### 4.3 Flushzeit

Die mittlere Flushzeit variierte signifikant zwischen der Perfadex- und Celsior-Gruppe. Die Flushkonservierung verlief in der Celsior-Gruppe mit  $341 \pm 53$  Sekunden signifikant schneller als in der Perfadex-Gruppe mit  $567 \pm 131$  Sekunden [Abbildung 5; Tabelle 8].



**Abbildung 5: Flushzeit**

Gruppenvergleich mittels einfaktorieller ANOVA

Signifikanz: Perfadex-Celsior:  $p = 0,007$

**Tabelle 8: Flushzeit**

	Sham	Perfadex	Celsior
Flushzeit [s]	entfällt	$567,0 \pm 131,3$	$341,0 \pm 53,2$

Gruppenvergleich	Signifikanzniveau (p)
Perfadex-Celsior	<b>0,007*</b>

Gruppenvergleich mittels einfaktorieller ANOVA

## 4.4 Kalte Ischämie- und Transplantationszeit

Die Gruppen Perfadex und Celsior zeigten keine Unterschiede in den kalten Ischämiezeiten sowie den Transplantationszeiten [Zeitintervall von der Ausklemmung der linken Lunge des Empfängers bis zur Reperfusion des Transplantats]. Die kalte Ischämiezeit betrug im Mittel ca. 27 Stunden. Zur Implantation des Transplantats wurde in etwa eine halbe Stunde benötigt [Tabelle 9].

**Tabelle 9:** Kalte Ischämiezeit und Transplantationszeit

	<b>Sham</b>	<b>Perfadex</b>	<b>Celsior</b>
<b>kalte Ischämie [s]</b>	entfällt	1622,6±52,7	1619,6±34,4
<b>Transplantzeit [min]</b>	einfällt	29,0±2,6	30,0±2,3

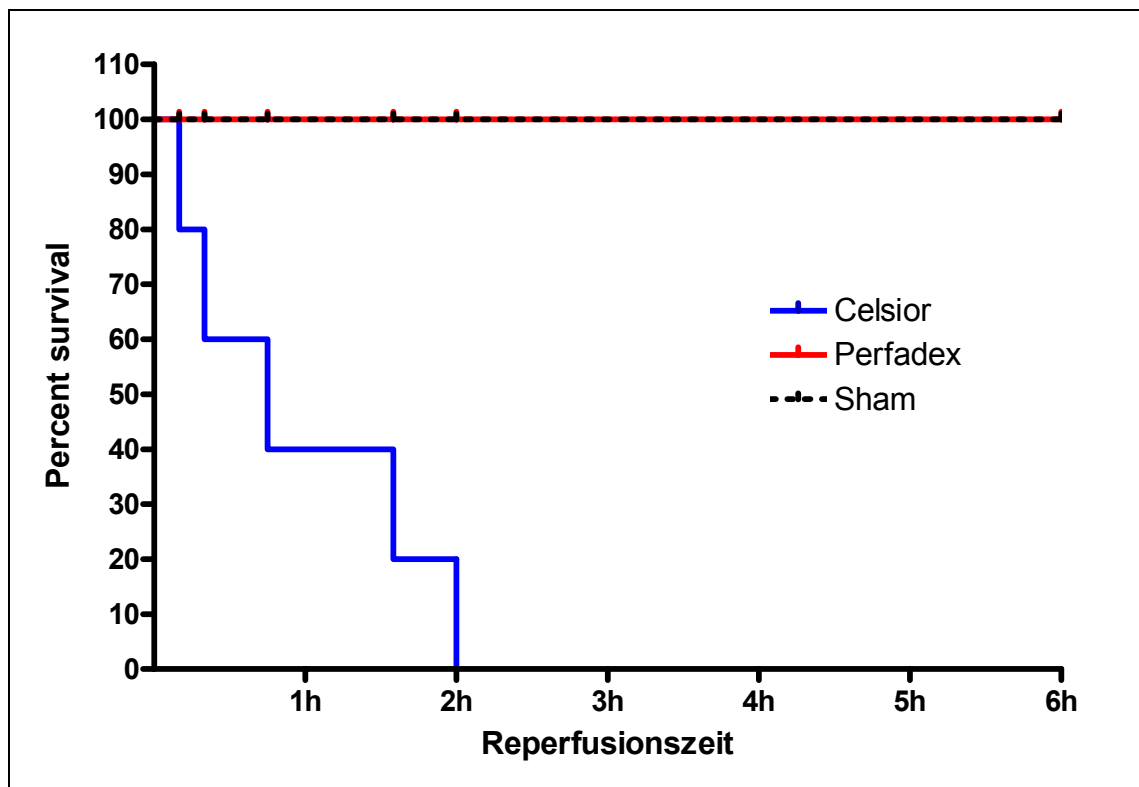
<b>Gruppenvergleich</b>	<b>Signifikanzniveau (p) kalte Ischämiezeit</b>	<b>Signifikanzniveau (p) Transplantationszeit</b>
Perfadex-Celsior	0,917	0,545

Gruppenvergleich mittels einfaktorieller ANOVA

## 4.5 Empfängertier

### 4.5.1 Mortalität

Alle Tiere der Perfadex-Gruppe sowie der Sham-Kontrollgruppe überlebten den kompletten Versuchszeitraum einschließlich der 6-stündigen-Nachbeobachtungsphase. Kein Tier der Celsior-Gruppe überlebte den vollständigen Nachbeobachtungszeitraum. Die Tiere verstarben im Mittel nach 58,0±47,8 Minuten. Dieser Unterschied zeigte sich in der statistischen Analyse als hoch signifikant [Abbildung 6].



**Abbildung 6: Kumulatives Überleben der Versuchsgruppen [Kaplan-Meier Survival Curve]**

Gruppenvergleich mittels Log-Rank Test

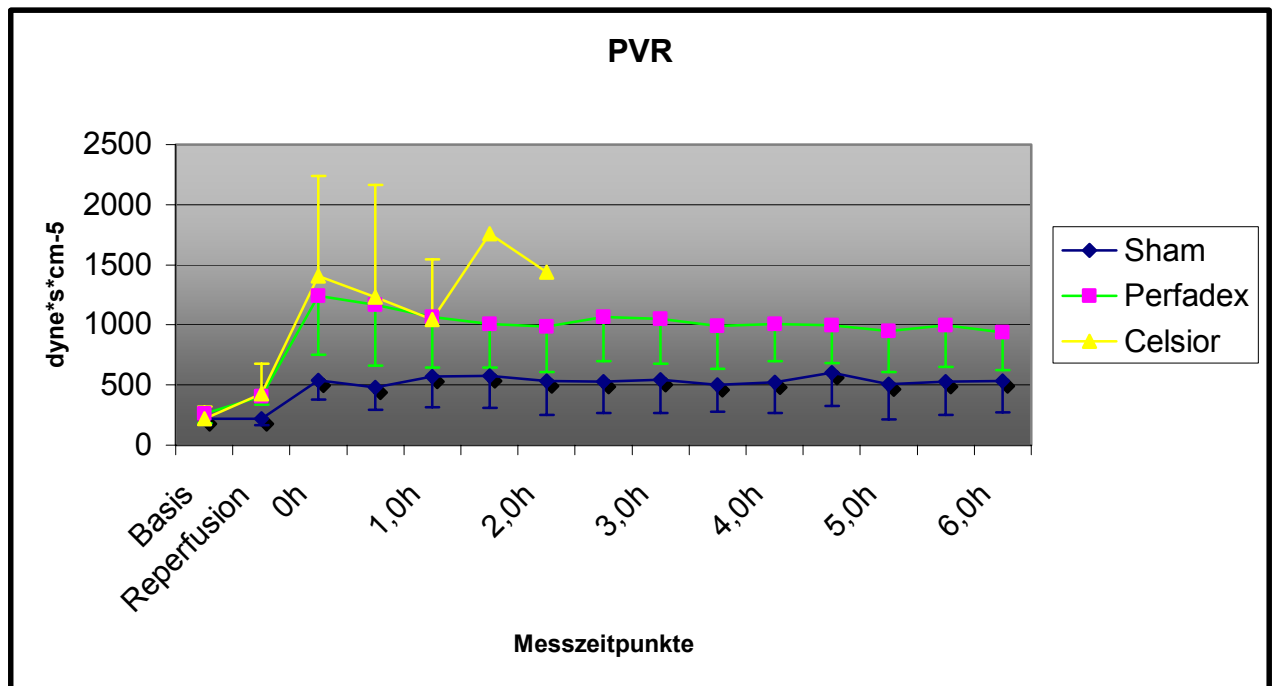
Signifikanz: Perfadex-Celsior  $p=0,002$

#### 4.5.2 Körpergewicht

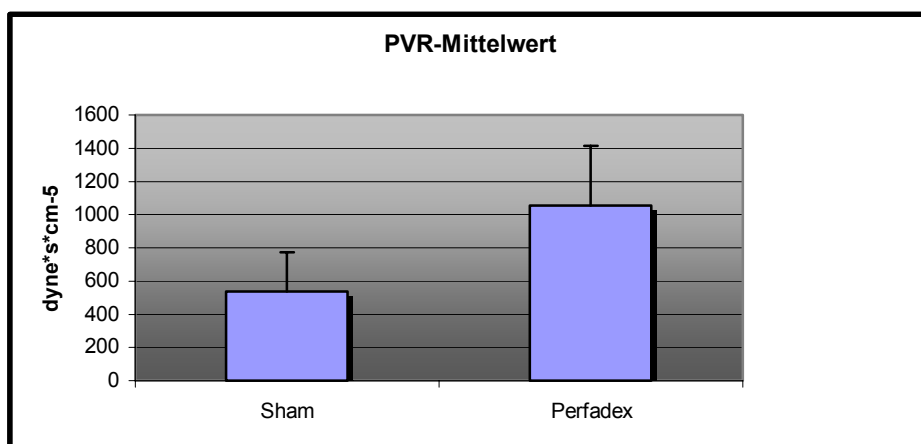
Die Gewichte der Empfängertiere variierten zwischen den Gruppen. Die Perfadex-Tiere wogen mit  $34,5 \pm 2,2$  kg durchschnittlich ca. 8 Kilogramm mehr als die Tiere der beiden anderen Gruppen [Tabelle 2]. Im Vergleich zu den Spendertieren waren die Empfängertiere mit einem Mittelwert von  $29,0 \pm 6,4$  kg schwerer.

#### 4.5.3 Pulmonalvaskulärer Widerstand

Der pulmonalvaskuläre Widerstand zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Perfadex und der Sham-Kontrollgruppe. Die Werte für die Perfadex-Gruppe lagen mit  $1053 \pm 360$   $\text{dyne} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$  konstant höher als die der Sham-Gruppe [ $535 \pm 237$   $\text{dyne} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$ ]. Die Celsior-Gruppe zeigte den schnellsten Anstieg auf die höchsten Werte aller Versuchsgruppen [Abbildung 7, 8; Tabelle 10].



**Abbildung 7: Pulmonalvaskulärer Widerstand [PVR] im zeitlichen Verlauf**  
 Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen  
 Signifikanz: Sham-Perfadex  $p=0,032$



**Abbildung 8: Pulmonalvaskulärer Widerstand [PVR]-Mittelwert**  
 Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen  
 Signifikanz: Sham-Perfadex  $p=0,032$

**Tabelle 10: Pulmonalvaskulärer Widerstand [PVR] der Empfängertiere**

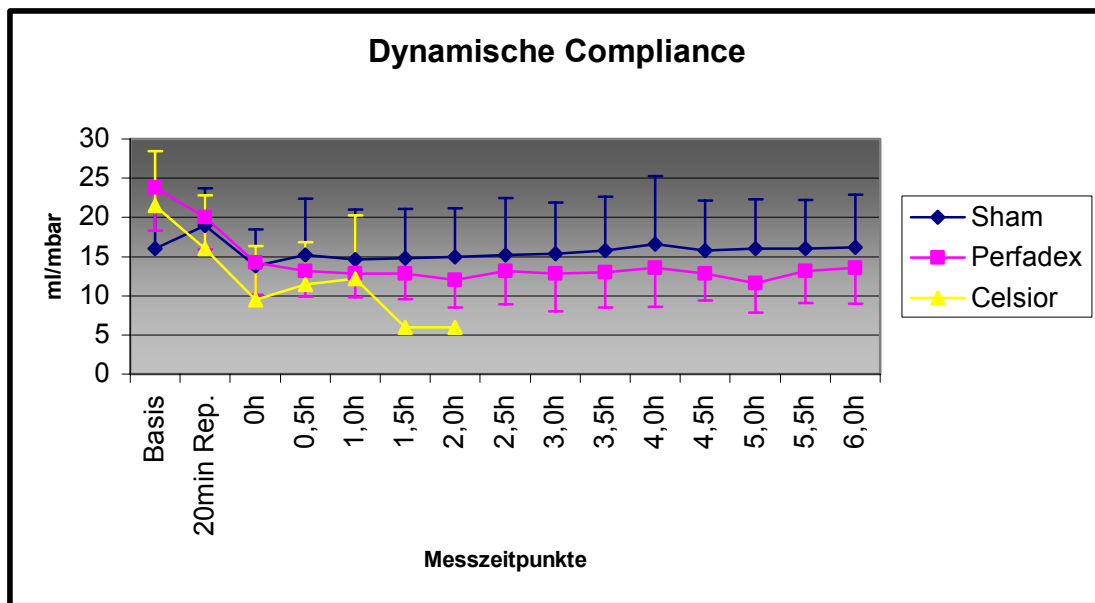
<b>PVR [dyne*s*cm<sup>-5</sup>]</b>	<b>Sham</b>	<b>Perfadex</b>	<b>Celsior</b>
<b>0</b>	539±164	1240±488	1409±828
<b>0,5 h</b>	479±184	1165±507	1233±933
<b>1,0 h</b>	572±258	1068±421	1047±499
<b>1,5 h</b>	574±263	1006±362	1760
<b>2,0 h</b>	532±281	987±382	1440
<b>2,5 h</b>	530±263	1068±372	
<b>3,0 h</b>	546±277	1048±372	
<b>3,5 h</b>	499±221	989±356	
<b>4,0 h</b>	525±258	1006±310	
<b>4,5 h</b>	602±279	997±317	
<b>5,0 h</b>	506±296	949±339	
<b>5,5 h</b>	527±276	999±349	
<b>6,0 h</b>	532±262	938±312	

<b>Gruppenvergleich</b>	<b>Signifikanzniveau (p)</b>
Sham-Perfadex	<b>0,032*</b>

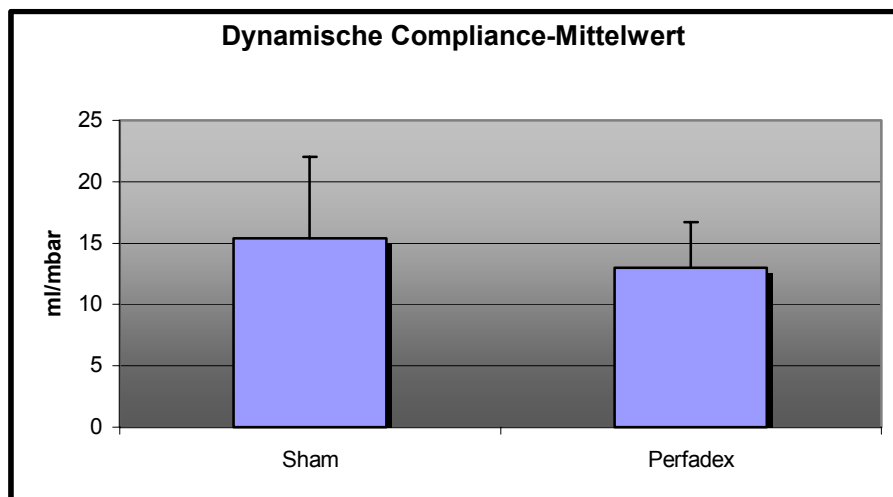
Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen

#### **4.5.4 Dynamische Compliance**

Die Werte der dynamischen Compliance waren sowohl in der Perfadex-Gruppe als auch in der Sham-Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum konstant. Zwischen diesen beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Dem gegenüber fiel die Compliance der Celsior-Gruppe schon nach 1,5 Stunden auf die niedrigsten Werte aller Versuchsgruppen ab [Abbildung 9, 10; Tabelle 11].



**Abbildung 9: Dynamische Compliance im zeitlichen Verlauf**  
 Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen  
 Signifikanz: *keine*



**Abbildung 10: Dynamische Compliance-Mittelwert**  
 Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen  
 Signifikanz: *keine*

**Tabelle 11: Dynamische Compliance der Empfängertiere**

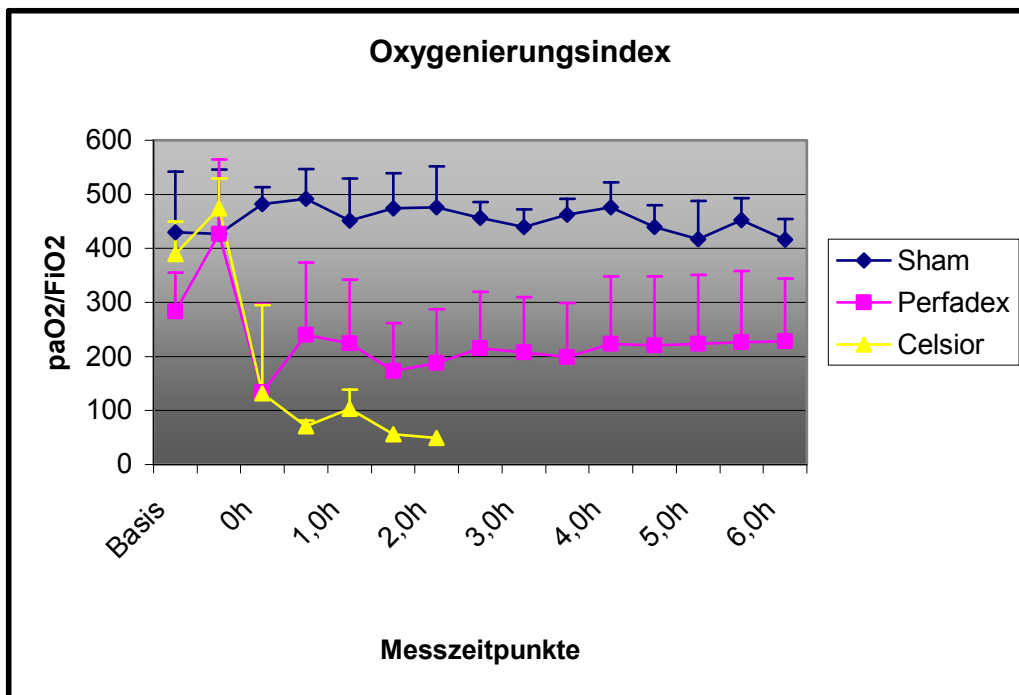
Compliance[ml/mbar]	Sham	Perfadex	Celsior
0	13,8±4,7	14,2±4,1	9,5±6,8
0,5 h	15,2±7,1	13,2±3,3	11,4±5,4
1,0 h	14,6±6,3	12,8±3,0	12,2±8,1
1,5 h	14,8±6,3	12,6±3,2	6,0
2,0 h	15,0±6,2	12,6±3,5	6,0
2,5 h	15,2±7,2	13,2±4,3	
3,0 h	15,4±6,5	12,8±4,8	
3,5 h	15,8±6,8	13,0±4,5	
4,0 h	16,6±8,6	13,6±5,0	
4,5 h	15,8±6,3	12,8±3,4	
5,0 h	16,0±6,8	11,6±3,8	
5,5 h	16,0±276	13,2±4,2	
6,0 h	16,2±6,6	13,6±4,6	

Gruppenvergleich	Signifikanzniveau (p)
Sham-Perfadex	0,499

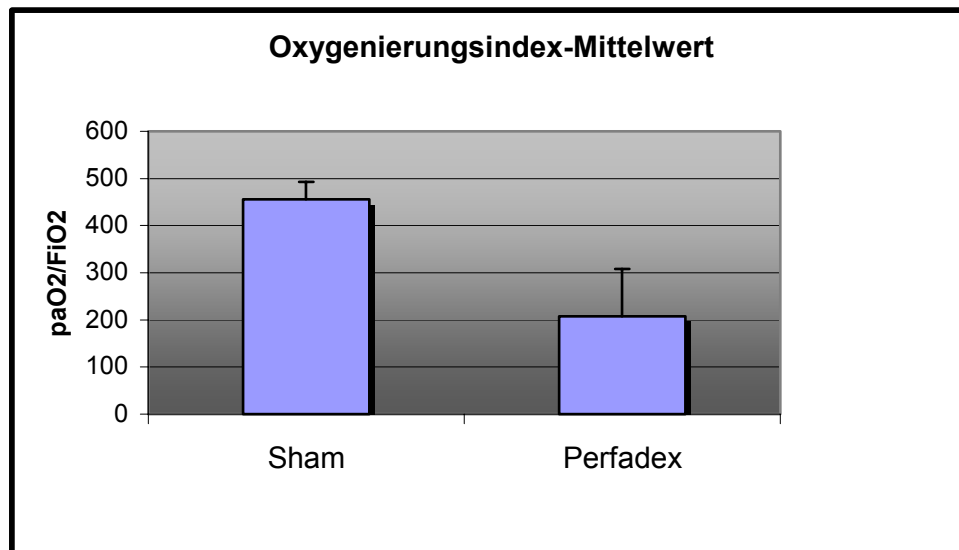
Gruppenvergleiche mittels ANOVA mit Messwiederholungen

#### 4.5.5 $p_aO_2/F_iO_2$ -Quotient

Es zeigten sich große gruppenspezifische Unterschiede in der Oxygenierungsleistung der transplantierten Organe. Die Perfadex-Gruppe zeigte mit  $208 \pm 99$   $p_aO_2/F_iO_2$  im Vergleich zur Sham-Kontrollgruppe mit  $456 \pm 37$   $p_aO_2/F_iO_2$  einen signifikant schlechteren Oxygenierungsindex. Auffallend war die steil abfallende Oxygenierungsleistung der Celsior-Transplantate auf die niedrigsten Werte aller Versuchsgruppen [Abbildung 11, 12; Tabelle 12].



**Abbildung 11: Oxygenierungsindex im zeitlichen Verlauf**  
 Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen  
 Signifikanz: Sham-Perfadex  $p=0,001$



**Abbildung 12: Oxygenierungsindex-Mittelwert**  
 Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen  
 Signifikanz: Sham-Perfadex  $p=0,001$



**Tabelle 12: Oxygenierungsindex [ $p_aO_2/F_iO_2$ ] der Empfängertiere**

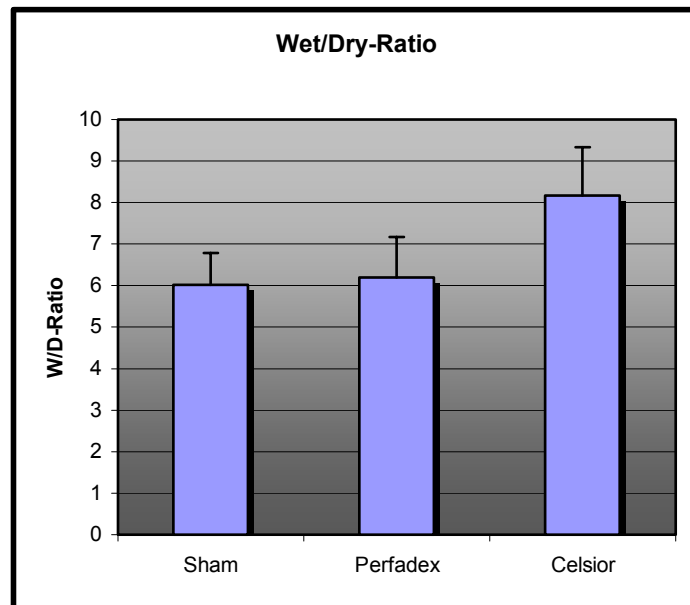
$p_aO_2/F_iO_2$	Sham	Perfadex	Celsior
0	482,8±31,2	135,0±162,8	132,3±162,7
0,5 h	492,2±54,6	240,0±133,8	71,8±10,5
1,0 h	451,4±78,2	224,6±118,2	103,6±35,9
1,5 h	474,4±64,9	173,6±88,8	56,7
2,0 h	476,8±75,7	188,9±99,4	49,2
2,5 h	456,8±29,9	215,0±104,7	
3,0 h	440,4±31,7	208,5±102,3	
3,5 h	462,0±29,4	199,8±100,5	
4,0 h	476,0±46,3	223,8±127,9	
4,5 h	440,0±39,8	220,9±128,7	
5,0 h	417,2±70,9	223,9±127,9	
5,5 h	452,8±41,0	226,4±131,6	
6,0 h	416,3±38,9	228,0±116,5	

Gruppenvergleich	Signifikanzniveau (p)
Sham-Perfadex	0,001

Gruppenvergleiche mittels ANOVA mit Messwiederholungen

## 4.6 Wet/Dry-Ratio

Der Flüssigkeitsgehalt der Lunge war in der Sham-Kontrolle mit einer mittleren W/D-Ratio von  $6,0 \pm 0,8$  am geringsten. Die Celsior-Gruppe zeigte mit Werten von  $8,2 \pm 1,2$  den größten Wasseranteil in der Lunge. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der Celsior-Gruppe und den beiden restlichen Versuchsgruppen [Abbildung 13; Tabelle 13].



**Abbildung 13: Wet/Dry-Ratio der transplantierten Lunge**

Gruppenvergleich mit ANOVA post-hoc Test [LSD]

Signifikanzen: Perfadex-Celsior  $p=0,018$

Sham-Celsior  $p=0,011$

**Tabelle 13: Wet/Dry-Ratio der transplantierten Lungen**

	Sham	Perfadex	Celsior
Wet/Dry-Ratio	6,0±0,7	6,2±1,0	8,2±1,2

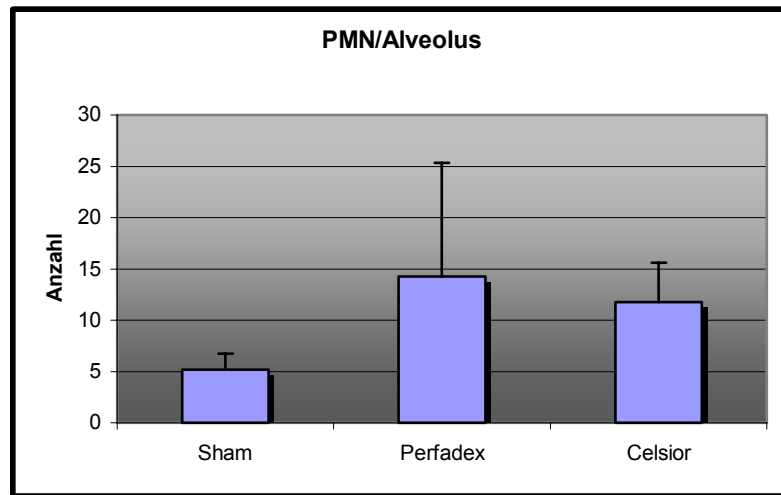
Gruppenvergleich	Signifikanzniveau (p)
Sham-Perfadex	0,724
Sham-Celsior	<b>0,011*</b>
Perfadex-Celsior	<b>0,018*</b>

Gruppenvergleich mittels ANOVA post-hoc Test [LSD]

## 4.7 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten pro Alveolus

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten, die während des Versuchszeitraums in das Alveolarlumen einwanderten, war in der Sham-Kontrollgruppe mit  $5,2 \pm 1,5$  Zellen pro Alveolus deutlich geringer als in der Perfadex- und Celsior-Gruppe. In der statistischen Analyse zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Celsior-

Lösung konservierten Lungen und den Lungen der Kontrollgruppe [Abbildung 14; Tabelle 14].



**Abbildung 14: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten [PMN] pro Alveolus**  
 Gruppenvergleiche mit ANOVA post-hoc Test [Tamhane]  
 Signifikanz: Sham-Celsior  $p=0,044$

**Tabelle 14: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten [PMN] pro Alveolus der transplantierten Lunge**

	Sham	Perfadex	Celsior
PMN/Alveolus	5,2±1,5	14,2±11,1	11,7±3,8

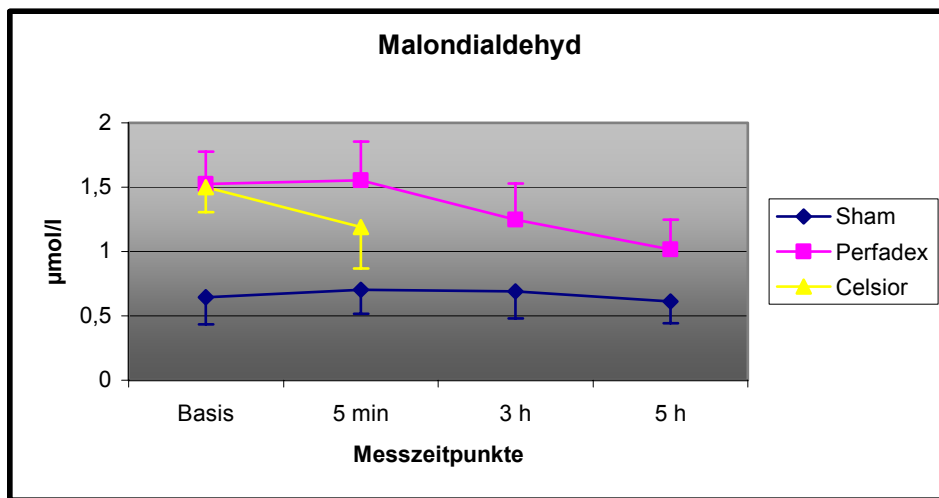
Gruppenvergleich	Signifikanzniveau (p)
Sham-Perfadex	0,371
Sham-Celsior	<b>0,044*</b>
Perfadex-Celsior	0,959

Gruppenvergleiche mittels ANOVA post-hoc Test [Tamhane]; PMN: polymorphkernige neutrophile Granulozyten

## 4.8 Malondialdehydkonzentration

Das Endprodukt der Lipidperoxidation zeigte in der Perfadex- und Celsior-Gruppe eine höhere Ausgangskonzentration als in der Sham-Kontrollgruppe. Dieser gruppenspezifische Unterschied erwies sich als signifikant. Die mittlere Ausgangskonzentration aller Tiere lag bei  $1,03 \pm 0,51 \mu\text{mol/l}$ . Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigte die Perfadex-Gruppe eine signifikante Änderung der

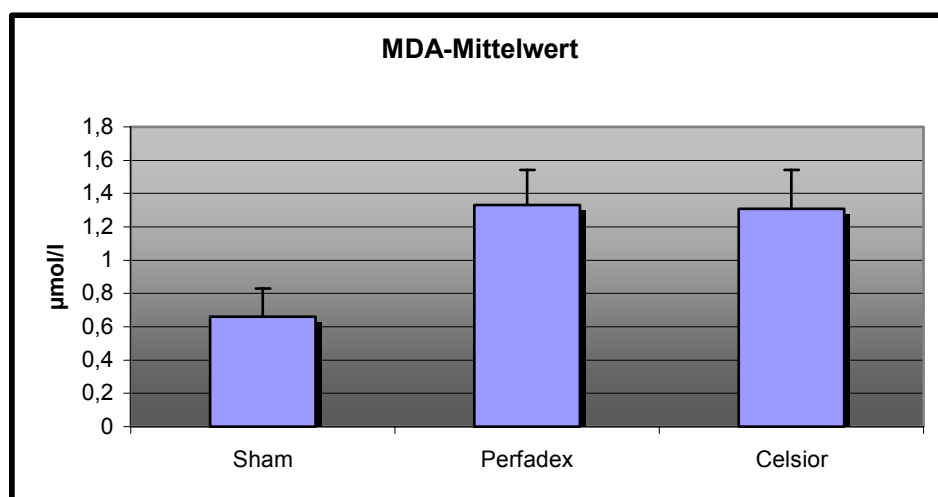
Malondialdehydkonzentration im zeitlichen Verlauf. Die Werte der Perfadex-Gruppe fielen gegen Ende der Nachbeobachtungsphase um  $0,51 \mu\text{mol/l}$  auf  $1,02 \mu\text{mol/l}$  ab, während die Werte der Sham-Gruppe über die gesamte Reperfusionsphase hinweg weitgehend konstant blieben [mittlere Serumkonzentration =  $0,66 \pm 0,19 \mu\text{mol/l}$ ]. Die Malondialdehyd-Serumkonzentration der Celsior-Gruppe zeigte den stärksten Abfall 5 Minuten nach Klemmung der rechten Lunge [Abbildung 15, 16; Tabelle 15].



**Abbildung 15: Malondialdehydkonzentration im zeitlichen Verlauf**

Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen

Signifikanz: Sham-Perfadex  $p=0,029$



**Abbildung 16: Malondialdehydkonzentration [MDA]-Mittelwert**

Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen

Signifikanz: Sham-Perfadex  $p=0,029$

**Tabelle 15****1.) Absoluter Serumspiegel Malondialdehyd [MDA]**

MDA [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Sham	Perfadex	Celsior
<b>Basiswert</b>	0,64 $\pm$ 0,21	1,53 $\pm$ 0,25	1,50 $\pm$ 0,20
<b>5 min</b>	0,70 $\pm$ 0,19	1,55 $\pm$ 0,31	1,19 $\pm$ 0,32
<b>3 h</b>	0,70 $\pm$ 0,21	1,25 $\pm$ 0,28	
<b>5 h</b>	0,61 $\pm$ 0,17	1,02 $\pm$ 0,21	

**2.) Zeitliche Änderung der Malondialdehydkonzentration [ $\mu\text{mol/l}$ ] zum Basiswert**

MDA-Änderung	Sham	Perfadex	Celsior
<b>Basiswert</b>	0	0	0
<b>5 min</b>	0,06 $\pm$ 0,12	0,04 $\pm$ 0,17	-0,31 $\pm$ 0,36
<b>3 h</b>	0,05 $\pm$ 0,17	-0,34 $\pm$ 0,32	
<b>5 h</b>	-0,03 $\pm$ 0,20	-0,56 $\pm$ 0,17	

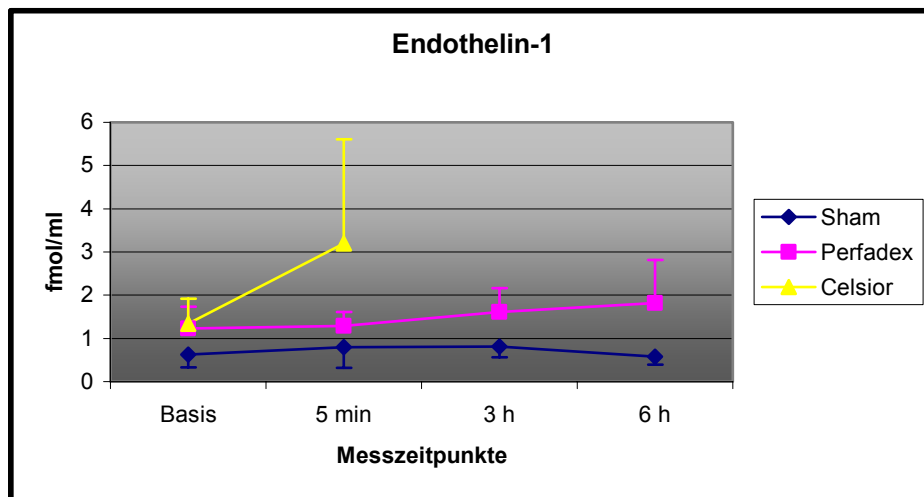
**3.) Gruppenvergleich der zeitlichen Änderung der MDA-Konzentration**

Gruppenvergleich	Signifikanzniveau (p)
Sham-Perfadex	<b>0,029*</b>

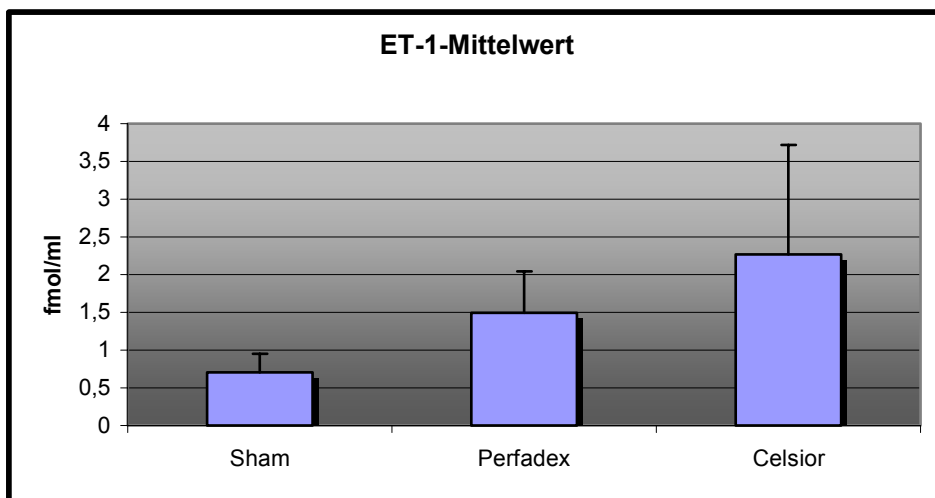
Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen; MDA: Malondialdehyd

## 4.9 Endothelin-1-Konzentration

Die Endothelin-1-Konzentration zeigte keinen signifikanten Unterschied der Basis-konzentrationen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Im Mittel lag der Ausgangs-Plasmaspiegel aller Gruppen bei 1,06 $\pm$ 0,46 fmol/ml. Die Werte der Perfadex-Gruppe [1,49 $\pm$ 0,55 fmol/ml] waren über den gesamten Versuchszeitraum konstant höher als die der Sham-Kontrollgruppe [0,71 $\pm$ 0,55 fmol/ml]. Die Celsior-Gruppe wies den stärksten Anstieg 5 Minuten nach Klemmung auf. Die mit Celsior-Lösung konservierten Lungen erreichten zu diesem Zeitpunkt die höchste Endothelin-1-Konzentration aller Testlungen mit 3,2 $\pm$ 2,4 fmol/ml. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf der Zuwächse bezogen auf den Basiswert. Es fiel auf, dass der Endothelin-1-Plasmaspiegel der Kontrollgruppe gegen Ende der Nachbeobachtungszeit auf Werte unter den Ausgangswert sank, wohingegen die Endothelin-1-Konzentration in der Perfadex-Gruppe während der gesamten Reperfusionphase leicht anstieg [Abbildung 17,18; Tabelle 16].



**Abbildung 17: Endothelin-1 im zeitlichen Verlauf**  
 Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen  
 Signifikanz: keine



**Abbildung 18: Endothelin-[ET-1]-Mittelwert**  
 Gruppenvergleich mittels ANOVA mit Messwiederholungen  
 Signifikanz: keine

**Tabelle 16**

**1.) Absoluter Serumspiegel Endothelin-1 [ET-1]**

<b>ET-1 [fmol/ml]</b>	<b>Sham</b>	<b>Perfadex</b>	<b>Celsior</b>
<b>Basiswert</b>	0,624±0,297	1,232±0,497	1,338±0,658
<b>5 min</b>	0,804±0,487	1,290±0,326	3,200±2,410
<b>3 h</b>	0,812±0,246	1,612±0,554	
<b>5 h</b>	0,582±0,188	1,814±1,000	

**2.) Zeitliche Änderung der Endothelin-1-Konzentration [fmol/ml] zum Basiswert**

<b>ET-1-Änderung</b>	<b>Sham</b>	<b>Perfadex</b>	<b>Celsior</b>
<b>Basiswert</b>	0	0	0
<b>5 min</b>	0,180±0,207	0,058±0,289	1,862±2,023
<b>3 h</b>	0,188±0,191	0,380±0,351	
<b>5 h</b>	0,042±0,357	0,582±0,570	

**3.) Gruppenvergleich der zeitlichen Änderung der ET-1-Konzentration**

<b>Gruppenvergleich</b>	<b>Signifikanzniveau (p)</b>
Sham-Perfadex	0,057

Gruppenvergleiche mittels Anova mit Messwiederholungen; ET-1: Endothelin-1

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion der angewandten Methodik

#### 5.1.1 Tiermodell

Im Hinblick auf die humane Lungentransplantation besitzen *in-vitro* Modelle an isolierten Organen sowie extrakorporale Kleintiermodelle im Vergleich zu Großtiermodellen eine geringere funktionelle Aussagekraft. Sie werden vor allem als kostengünstige Screeningverfahren eingesetzt. Die Ergebnisse der Kleintiermodelle müssen vor der klinischen Umsetzung durch ein entsprechendes *in-vivo* Großtiermodell verifiziert werden. Wegen der anatomischen und physiologischen Nähe zum Menschen werden experimentelle Untersuchungen an Schweinen von vielen Arbeitsgruppen bevorzugt (Hughes, 1986). Die Zucht und Haltung von Schweinen ist im Vergleich zu anderen Großtieren kostengünstig. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere stammten aus einer landwirtschaftlichen, kontrollierten Zuchtlinie [s. Kapitel 3.1]. Somit konnte eine einheitliche Qualität der Tiere bezüglich Infektionen und anatomischer Anomalien weitgehend garantiert werden. In dieser experimentellen Studie wurde ein orthotopes Transplantationsmodell gewählt. Nach Entnahme des Herz-Lungen-Blocks und anschließender ischämischer Lagerung wurde eine Einzellungentransplantation auf ein Empfängertier durchgeführt (Kirk et al., 1993; Clark et al., 1999). Die kontralaterale Lunge wurde zur alleinigen Beurteilung des Transplantats hinsichtlich Oxygenierungsleistung und hämodynamischer Stabilität aus dem Kreislauf ausgeklemmt. Dieser Versuchsablauf hat große Ähnlichkeit mit der klinischen Lungentransplantation und lässt eine gute Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen zu. Bei diesem Modell kommt keine Herz-Lungen-Maschine zum Einsatz, wodurch die Qualität der Organkonservierung einen großen Einfluss auf die postoperative Transplantatfunktion besitzt (Steen et al., 1994a; Greco et al., 1999). Die Beurteilung des Ischämie-Reperfusionsschadens ist somit eng mit der gewählten Operationsmethode verknüpft.

Die Flushkonservierung wurde in jeder Gruppe mit 60 ml/kg Körpergewicht der Konservierungslösung bei 4 °C durchgeführt. Dies entspricht der Lungenkonservierung beim Menschen (Hopkinson et al., 1998). Um die Auswirkungen der Lösungen isoliert



beurteilen zu können, wurde auf die Zugabe von Additiven, wie z. B. Prostaglandine verzichtet.

Als Kontrollgruppe kamen „sham-operierte“ Tiere zum Einsatz. Bei diesen wurden bis zur Hilusfreilegung die gleichen Operationsschritte wie bei den Empfängertieren angewandt. Der Unterschied bestand in der Ausklemmung der rechten Lunge ohne Implantation eines Spenderorgans. Die Funktion der Sham-Lunge wurde somit nicht den schädigenden Einflüssen der Konservierung, Ischämie und Reperfusion, sondern lediglich den präparatorischen Traumen ausgesetzt. In vielen experimentellen Modellen zur Lungentransplantationsforschung wird die EC-Lösung als Kontrollgruppe gewählt. Diese in den letzten Jahren verwendete Standardlösung gilt in der neueren Literatur hinsichtlich der Transplantatfunktion jedoch als überholt (Yamazaki et al., 1990; Novick et al., 1992; Sundaresan et al., 1993; Ingemansson et al., 1995; Barr et al., 1997; Struber et al., 2001; Muller et al., 2002).

Die kalte Ischämiezeit der Lunge lag im Mittel bei 27 Stunden und war somit deutlich länger als die in der klinischen Praxis sonst üblichen 6-8 Stunden. Die Verlängerung der Ischämiezeit ermöglicht die Erweiterung des Spenderpools. Mit Zeiten über 20 Stunden könnten längere Transportzeiten und somit ein größerer Einzugsradius potentieller Spenderlungen ermöglicht werden (Conte & Baumgartner, 2000; de Perrot et al., 2003).

Die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe wurde auf 5 Spender- und 5 Empfängertiere festgelegt. Diese Menge gilt aufgrund der ethischen Vertretbarkeit im Sinne des Tierschutzes in der internationalen Literatur als Standard für Großtierexperimente und erfüllt die Anforderungen der statistischen Auswertbarkeit (Strüber et al., 2000).

### **5.1.2 Standardbedingungen**

Die Tiere wurden randomisiert den drei Versuchsgruppen zugeteilt. Die Operation der Tiere, die ischämische Lagerung sowie die Nachbeobachtungsphase erfolgten nach einem standardisierten Protokoll. Die Versuchsparameter wurden unter standardisierten Bedingungen, d. h. mit den gleichen Methoden und Geräten, erhoben.

### 5.1.3 Versuchsparameter

Zur Untersuchung der postischämischen Lungenfunktion werden in der internationalen Forschung vielfältige Parameter eingesetzt. Auf der einen Seite ist es möglich, die Transplantatfunktion durch funktionelle und morphologische Parameter zu beurteilen (Haverich et al., 1985; Kirk et al., 1993). Auf der anderen Seite gibt es unterschiedliche Parameter auf zellulärer Ebene, die genauere Aussagen über die Pathophysiologie und -biochemie des Ischämie-Reperfusionsschaden zulassen. Eine detaillierte Beurteilung des Ischämie-Reperfusionsschadens ist nur durch eine Kombination aller oben genannten Parameter möglich.

Während der Flush-Konservierung wurden der Flushperfusionsdruck und die Flushzeit bestimmt. Diese Parameter geben eine funktionelle Aussage über das Gefäßbett der Lunge sowie über die physikalischen Eigenschaften der Konservierungslösung.

Die funktionelle Analyse ist ein wichtiger Bestandteil zur Beurteilung der Qualität der Organkonservierung. Vor allem sind die Gasaustauschfunktion und die Hämodynamik von großem Interesse, weil sie limitierende Faktoren der Transplantation darstellen und mit der Schwere des Ischämie-Reperfusionsschadens korrelieren (Kirk et al., 1993). Die pulmonale Hämodynamik wird durch den aus dem pulmonalarteriellen Druck berechneten pulmonalvaskulären Widerstand repräsentiert. Dieser Parameter ist neben der Konservierungsqualität auch von der Denervation der Lunge und den Gefäßanastomosen abhängig. Deshalb sollten gruppenspezifische Unterschiede differenziert betrachtet und der Ischämie-Reperfusionsschaden nicht als alleinige Ursache gesehen werden (Haverich et al., 1985; Haverich et al., 1986). Die Gewebeeigenschaften der Lunge und die Strömungsverhältnisse werden mittels der dynamischen Compliance beurteilt (Müller et al., 1999; Strüber et al., 2001). Dieser Parameter gilt auch in der klinischen Praxis der Lungentransplantation als Vorhersagewert für das Transplantatüberleben und die intensivmedizinische Beatmungszeit (Strüber et al., 2001). Die Gasaustauschfunktion wird in der Literatur als globaler Maßstab für die Beurteilung der Konservierungsqualität beschrieben (Steen et al., 1994b; Speich et al., 2001; Steen et al., 2001). Als Zielgröße der Oxygenierungsleistung wurde in dieser Studie der arterielle Sauerstoffpartialdruck bestimmt. Unter Berücksichtigung der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration wurde der Index des  $p_aO_2$  [ $p_aO_2/F_iO_2$ ] berechnet.

Ein seit Anfang der Lungentransplantation beschriebener Parameter zur Evaluation des Ischämie-Reperfusionsschadens ist die Wet/Dry-Ratio (Haverich et al., 1985; Grover et al., 1997). Durch Berechnung der Gewichts Differenz einer Gewebeprobe vor und nach der Trocknung kann man den Wassergehalt der Lunge bestimmen. Dieser lässt Rückschlüsse auf eine erhöhte Kapillarpermeabilität als Folge des Ischämie-Reperfusionsschadens zu. Die Quantifizierung des intrapulmonalen Ödems durch die Bestimmung der Wet/Dry-Ratio ist jedoch wesentlich ungenauer als neuere stereologische Analysen. Aufgrund des geringen technischen Aufwands und der einfachen Durchführung ist die Wet/Dry-Ratio jedoch weiterhin eine anerkannte Methode zur Ödemquantifizierung (Chien et al., 2000).

Zur pathobiochemischen Evaluation des Ischämie-Reperfusionsschadens wurden die serologischen Parameter Malondialdehyd und Endothelin-1 bestimmt. Malondialdehyd, ein Endprodukt der Lipidperoxidation, wird in der Literatur als Marker des durch freie Radikale hervorgerufenen Lungenschadens beschrieben (Eschwege et al., 1999; Erkasap & Ates, 2000). Endothelin-1 wird vom Gefäßendothel der Lungengefäße sezerniert und wirkt vasokonstriktorisch auf die pulmonalen Gefäße. Zusätzlich besitzt Endothelin-1 eine bronchokonstriktorische Komponente. Da in der gesunden humanen Lunge nur wenig Endothelin-1 freigesetzt wird, besitzt eine hohe postischämische Konzentration eine große Aussagekraft bezüglich der Endothelschädigung (Mizutani et al., 1998; Stammberger et al., 1999).

Ein Maß des frühen Reperfusionsschadens ist die Einwanderung von polymorphen neutrophilen Granulozyten in das Lungenparenchym (Zimmerman & Granger, 1994). Polymorphe neutrophile Granulozyten setzen verschiedene Mediatoren wie Proteinasen frei und bewirken eine Schädigung des pulmonalen Endothels mit anschließender Entwicklung eines Ödems (Hogg, 1987). LPD-Lösungen wirken suppressiv auf die PMN-Chemotaxis und sollen die Einwanderung der Zellen in das Parenchym verhindern (Sakamaki et al., 1999).

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Ergebnisse der Spendertiere**

Sowohl in der Perfadex- als auch in der Celsior-Gruppe wurde der gleiche Eingriff in standardisierter Weise durchgeführt. Dementsprechend ergaben sich keine gruppenspezifischen Unterschiede in der Hämodynamik und der Gasaustauschfunktion der Spendertiere. Die kalte Ischämiezeit lag in beiden Gruppen bei ca. 27 Stunden mit einer anschließenden Transplantationszeit von einer halben Stunde. Die gewählte Ischämiezeit ist hierbei weit länger als die in der Klinik praktizierten 6-8 Stunden. Beide Lösungen wiesen im extrakorporalen Kleintiermodell eine vergleichbare Konservierungsqualität bei 4 Stunden Ischämie auf. Um die funktionelle Gleichheit der Konservierungsqualität beider Lösungen am *in-vivo* Großtiermodell zu verifizieren oder mögliche Unterschiede sichtbar zu machen, wurde die Ischämiezeit auf 27 Stunden ausgedehnt (Hausen et al., 1997; Gorler & Haverich, 2000). Gleichzeitig ist es für die klinische Anwendung von großer Bedeutung, die Ischämiezeit zu verlängern, um das Einzugsgebiet der Spenderlungen zu vergrößern (Grover et al., 1997).

Während der Flushperfusionsdruck keinen gruppenspezifischen Unterschied zeigte, war die Flushzeit der Perfadex-Gruppe signifikant länger als die der Celsior-Gruppe. Beide Lösungen beinhalten eine geringe  $K^+$ -Konzentration, durch die der vaso-konstriktorischen Wirkung des Kaliums entgegengewirkt werden konnte. Die Celsior-Lösung beeinflusst durch den Magnesiumgehalt von 13 mmol/l die Kalziumhomöostase (Menasche et al., 1994). Hierdurch reduziert sich der intrazelluläre Kalziumspiegel der glatten Muskelzelle, der Gefäßtonus wird vermindert und somit die Flushzeit verkürzt. Durch den Dextrananteil der Perfadex-Lösung steigt die Viskosität der Lösung an, was ebenfalls zu einer Verlängerung der Flushzeit beiträgt (Fukuse et al., 1996).

### **5.2.2 Ergebnisse der Empfängertiere**

Celsior und Perfadex wiesen im extrakorporalen Kleintiermodell unserer Forschungsgruppe eine ähnlich gute Konservierungsqualität auf (Wittwer et al., 1999b;

Wittwer et al., 1999a). Hingegen verstarben im hier beschriebenen *in-vivo* Großtiermodell alle Tiere der Celsior-Gruppe nach  $58 \pm 47$  Minuten an akutem Rechter Herzversagen. Dieser Unterschied zum extrakorporalen Kleintiermodell ist hauptsächlich auf die Verlängerung der Ischämiezeit auf 27 Stunden zurückzuführen. Das irreversible Rechter Herzversagen wird in der Literatur als Merkmal eines schweren Ischämie-Reperfusionsschadens beschrieben (Hohlfeld et al., 1999). Die positiven Ergebnisse der internationalen Celsior-Forschung konnten in dieser Studie somit nicht bestätigt werden. Es ist anzumerken, dass bei den wenigen *in-vivo* Untersuchungen mit der Celsior-Lösung deutlich kürzere Ischämiezeiten zum Einsatz kamen (Xiong et al., 1999). Die meisten Arbeitsgruppen bedienten sich darüber hinaus extrakorporaler Modelle, die aufgrund kürzerer Ischämiezeiten und fehlender klinischer Kompatibilität keine genauen Aussagen hinsichtlich gruppenspezifischer Unterschiede zulassen (Barr et al., 1997; Fehrenbach et al., 1999).

Die Tiere der Perfadex-Gruppe sowie der Sham-Kontrollgruppe überlebten zu 100 % den kompletten Versuchszeitraum einschließlich Nachbeobachtungsphase. Der pulmonalvaskuläre Widerstand als Maß der Konservierungsqualität des pulmonalen Gefäßsystems lag in der Perfadex-Gruppe konstant höher als in der Sham-Gruppe. Es zeigte sich jedoch kein schneller Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstands, wie es in der Celsior-Gruppe der Fall war. Schäden der pulmonalen Strombahn äußern sich unter anderem durch Schwankungen und hohe Anstiege des pulmonalvaskulären Widerstands.

Es wird in der Literatur beschrieben, dass gruppenspezifische Unterschiede der pulmonalen Hämodynamik nicht zwangsläufig mit der Oxygenierungsleistung der transplantierten Lunge korrelieren müssen [s. Kapitel 5.1.3] (Haverich et al., 1985). In der vorgelegten Studie verhält sich jedoch der Oxygenierungsindex als Parameter der Gasaustauschfunktion passend zur pulmonalen Hämodynamik. Es zeigten sich signifikant niedrigere Werte in der Perfadex-Gruppe als in der Sham-Kontrollgruppe. Der Parameter des Gasaustauschs verhält sich in der Perfadex-Gruppe konstant und weist eine leicht ansteigende Tendenz gegen Ende des Versuchs auf.

Die negativen Ergebnisse der Celsior-Gruppe werden durch einen raschen Abfall des Oxygenierungsindex weiter bestätigt. Betrachtet man die Oxygenierungsleistung als aussagefähigsten Parameter hinsichtlich der Beurteilung der Lungenkonservierungsqualität, ist Perfadex als Konservierungslösung der Celsior-Lösung nach den Ergebnissen dieser Studie überlegen.

Der schnelle Abfall der dynamischen Lungencompliance auf die niedrigsten Werte aller Versuchsgruppen korrespondierten mit der schlechten Oxygenierungsleistung und pulmonalen Hämodynamik der Celsior-Gruppe.

Die Evaluierung des intrapulmonalen Ödems mittels Bestimmung der Wet/Dry-Ratio betont die schlechten Ergebnisse der Celsior-Lösung. Der intrapulmonale Wassergehalt zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Celsior-Gruppe und den beiden anderen Versuchsgruppen auf. Während die Kontrollgruppe hinsichtlich der Flüssigkeitsmenge die niedrigsten Werte aufwies, konnte in der Celsior-Gruppe die höchsten Werte bestimmt werden. Diese Ergebnisse korrelierten wiederum mit dem Plasmaspiegel von Endothelin-1. Dieser stieg 5 Minuten nach Klemmung der rechten Lunge auf die höchsten Werte aller Versuchsgruppen. Die Endothelin-1-Konzentration der Perfadex-Gruppe lag konstant höher als die der Sham-Kontrollgruppe, ohne jedoch eine Signifikanz aufzuweisen. Endothelin-1 gilt als Marker der Endothelschädigung, der über seine vasokonstriktorische Komponente den pulmonalvaskulären Widerstand erhöht und die Ausbildung eines Ödems bewirkt. In der Literatur wird beschrieben, dass der Endothelin-1-Spiegel ca. 3-6 Stunden nach Reperfusion sein Maximum erreicht (Shennib et al., 1995; Mizutani et al., 1998). Der überaus schnelle Anstieg des Endothelin-1-Plasmaspiegels der Celsior-Gruppe kann somit als besonders schnelle und starke Ausprägung eines Ischämie-Reperfusionsschadens mit starker Endothelschädigung interpretiert werden. Die vergleichbar guten Werte des Endothelin-1-Plasmaspiegels, der Perfadex- und Sham-Gruppe, betonen die Überlegenheit der Perfadex-Lösung hinsichtlich der Konservierungsqualität.

Zur Beurteilung der Lungenschädigung durch freie Radikale wurde der Serumspegel des Malondialdehyds als Maß der Lipidperoxidation bestimmt (Eschwege et al., 1999). Der Ausgangswert des Malondialdehyds lag in der Perfadex-Gruppe signifikant höher als in der Sham-Kontrollgruppe. Auch im zeitlichen Verlauf zeigte die Perfadex-Gruppe signifikant höhere Werte, die jedoch gegen Versuchsende tendenziell abnahmen. Es konnten keine gruppenspezifischen Unterschiede zwischen Perfadex und Celsior gefunden werden. Sakamaki et al. beschrieben eine signifikante Reduktion der Lipidperoxidation durch eine Konservierung der Lunge mit LPD-Lösung (Sakamaki et al., 1997). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Studie nach Bestimmung der Malondialdehyd-Spiegel nicht bestätigt werden.

Die Bestimmung der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Lungenparenchym ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Sham-Gruppe zeigte die geringste Zellzahl, während die Celsior-Gruppe die größte Zahl eingewanderter neutrophiler Granulozyten pro Alveolus aufwies. Wie in Kapitel 2.4.3.3 beschrieben lässt die Anzahl der eingewanderten Granulozyten eine gute Beurteilung des Ischämie-Reperfusionsschadens zu (Sakamaki et al., 1999). Die große Anzahl von neutrophilen Granulozyten pro Alveolus in der Celsior-Gruppe und die damit verbundene Triggerung der Parenchymschädigung durch Lipasen, Proteasen und freie Sauerstoffradikale korrespondieren mit den übrigen extrem schlechten Ergebnissen der pulmonalen Hämodynamik, Oxygenierungsleistung sowie Ödemquantifizierung und Endothelin-1-Konzentration.

### **5.2.3 Beurteilung der Konservierungslösungen**

Die Perfadex-Lösung ist der Celsior-Lösung bei Ischämiezeiten von ca. 27 Stunden weit überlegen. Das frühe Versterben aller Tiere der Celsior-Gruppe an Rechtsherzversagen sowie ein Großteil der Parameter bestätigen die schlechtere Konservierungsqualität der Celsior-Lösung.

Besonders die Ergebnisse der Endothelin-1-Messung bestätigen die von Ingemansson et al. beschriebene gute Konservierung des Pulmonalendothels und der damit verbundenen Aufrechterhaltung der Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen mit der Perfadex-Lösung (Ingemansson et al., 1995). Die guten Ergebnisse der Celsior-Lösung verschiedener Forschungsgruppen können im *in-vivo* Großtiermodell der vorgelegten Studie mit ausgedehnter Ischämiezeit nicht bestätigt werden. Diese guten Ergebnisse der Celsior-Lösung wurden durch den Zusatz von Antioxidantien wie Glutathion, Radikalfängern und Impermeantien wie z. B. Mannitol [s. Kapitel 2.5.1] sowie durch die ionale Zusammensetzung der Lösung erklärt. Beide Lösungen sind extrazelluläre Lösungen mit einem geringen Kaliumgehalt. Die niedrige Kaliumkonzentration verhindert eine pulmonale Vasokonstriktion und somit die Ausbildung eines Zellödems (Ono et al., 1998) [s. Kapitel 2.5.1]. Da die Perfadex-Lösung keine der oben genannten Substanzen der Celsior-Lösung beinhaltet und sich die ionale Zusammensetzung ähnelt, muss der Vorteil der Perfadex-Lösung im Zusatz von Dextran 40 und 1 % Glukose gesehen werden (Keshavjee et al., 1992; Date et al., 1993b). Dextran 40 ist ein Makromolekül mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 40000 D. Es verbessert die Mikrozirkulation und trägt zu einer

verbesserten Transplantatfunktion bei. Dextran 40 umhüllt bereits aggregierte Erythrozyten und bewirkt die Auflösung des Aggregats. Weitere Vorteile von Dextran liegen in der Fähigkeit, die Verformbarkeit von Erythrozyten zu steigern. Dies verbessert die Mikrozirkulation der roten Blutkörperchen im kapillaren Gefäßbett. Zusätzlich wird dem Dextran ein antithrombotischer Effekt durch Umhüllung von Thrombozyten und Endothelzellen zugeschrieben (Keshavjee et al., 1992; Fukuse et al., 1996). Die verbesserte Mikrozirkulation im Transplantat verhindert die Ausbildung eines „no-reflow Phänomens“ (Pegg, 1986). Dieses Phänomen stellt eine schwerwiegende Komplikation durch verminderte Mikrozirkulation im Transplantat dar, bei dem die Kapillaren durch Erythrozytenaggregate vollständig verlegt sind. Aufgrund des akuten Rechtsherzversagens und der schlechten Ergebnisse der pulmonalen Hämodynamik kann das no-reflow Phänomen als Todesursache der Celsior-Gruppe angenommen werden.

Neben dem positiven Effekt von Dextran auf die Lungenfunktion des Transplantats wird die Lebensfähigkeit des Bronchialsystems verbessert. Durch einen gesteigerten kapillaren Blutfluss werden auch die Kollateralen zwischen dem pulmonalen und bronchialen Gefäßsystem besser durchblutet. Das transplantierte Bronchialsystem ist in den ersten postoperativen Tagen auf die Blutversorgung über diese Kollateralen angewiesen, da das bronchiale Gefäßsystem noch nicht vollständig rekonstruiert ist. Durch den Zusatz von 1 % Glukose zur LPD-Lösung wird der transplantierten Lunge eine zusätzliche Energieressource zur aeroben Verstoffwechselung bereitgestellt. Weber und Visscher zeigten, dass die Lunge in der Lage ist, Kohlenhydrate exklusiv zur Deckung des eigenen Energiebedarfs zu verstoffwechseln (Weber & Visscher, 1969). Die Fähigkeit der Lunge, aus Glukose Phospholipide zu synthetisieren und dadurch den Surfactantgehalt der Alveolen aufrechtzuerhalten, wird als weiterer wichtiger Vorteil der Glukosezugabe gesehen (Scholz et al., 1972).



## 5.4 Schlussfolgerung

Die EC-Lösung stellte über viele Jahre den internationalen Standard der Lungenkonservierung dar. Heute kann sie aufgrund internationaler Forschungsergebnisse im Vergleich zu modernen extrazellulären Lösungen hinsichtlich der Konservierungsqualität als inadäquat bezeichnet werden.

In der vorgelegten Studie wurde der Einfluss der modernen Konservierungslösungen Perfadex und Celsior auf den Ischämie- und Reperfusionsschaden nach experimenteller Lungentransplantation am *in-vivo* Großtiermodell untersucht. Beide Lösungen werden in der Literatur als qualitativ hochwertige Konservierungsmedien für die Lungentransplantation beschrieben. Zur Aufdeckung möglicher Unterschiede zwischen den Lösungen wurde die Ischämiezeit von den in der klinischen Praxis üblichen 6-8 Stunden auf 27 Stunden ausgedehnt.

Die Perfadex-Lösung erwies sich hinsichtlich der Konservierungsqualität der Celsior-Lösung als überlegen. Die Ergebnisse der Untersuchung unterstreichen eine zuverlässige Anwendung von Perfadex in der klinischen Praxis der Lungentransplantation. Durch den Einsatz von Perfadex zur Organkonservierung lässt sich die bisherige Ischämiezeit in der Lungentransplantation deutlich verbessern. Hierdurch ist eine positive Auswirkung auf die Anzahl der Spenderorgane zu erwarten.

Das frühe Auftreten eines schweren Ischämie-Reperfusionsschadens macht die Verwendung der reinen Celsior-Lösung für die klinische Anwendung in der Lungenkonservierung ungeeignet. Die theoretischen Vorteile sowie die guten Ergebnisse der Celsior-Lösung in verschiedenen Kleintiermodellen geben jedoch Anlass, die Lösung durch Zusätze wie z. B. Dextran weiter zu optimieren.

Trotz guter Ergebnisse der Perfadex-Gruppe zeigten sich zum Teil signifikante Unterschiede zur Sham-Kontrollgruppe. Die Verbesserung der Lösung mit verschiedenen Additiven sollte Gegenstand der auf dieser Studie aufbauenden Forschung sein. Außerdem ist die Untersuchung neuer Perfusionskonzepte [z. B. retrograde Technik] eine Möglichkeit, die bestehenden Defizite zu beseitigen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adoumie R, Serrick C, Giaid A and Shennib H (1992). Early cellular events in the lung allograft. *Ann Thorac Surg* 54:1071-1076; discussion 1076-1077.
- Aitchison J, Orr HE, Flecknell PA, Kirby JA and Dark JH (2001). Functional assessment of non-heart-beating donor lungs: prediction of post-transplant function. *Eur J Cardiothorac Surg* 20: 187-194.
- Albes JM, Brandes H, Heinemann MK, Scheule A and Wahlers T (1997). Potassium-reduced lung preservation solutions: a screening study. *Eur Surg Res* 29:327-338.
- Al-Mehdi AB, Shuman H and Fisher AB (1997). Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am J Physiol* 272:L294-300.
- Al-Mehdi AB, Zhao G and Fisher AB (1998a). ATP-independent membrane depolarization with ischemia in the oxygen-ventilated isolated rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:653-661.
- Al-Mehdi AB, Zhao G, Dodia C, Tozawa K, Costa K, Muzykantov V, Ross C, Blecha F, Dinauer M and Fisher AB (1998b). Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K<sup>+</sup>. *Circ Res* 83:730-737.
- Alvarez A, Salvatierra A, Lama R, Algar J, Cerezo F, Santos F, Robles JC, Baamonde C and Pujol JL (1999). Preservation with a retrograde second flushing of Eurocollins in clinical lung transplantation. *Transplant Proc* 31:1088-1090.
- Anyanwu AC, McGuire A, Rogers CA and Murday AJ (2002). An economic evaluation of lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123:411-418; discussion 418-420.
- Arbibe L, Koumanov K, Vial D, Rougeot C, Faure G, Havet N, Longacre S, Vargaftig BB, Bereziat G, Voelker DR, Wolf C and Touqui L (1998). Generation of lyso-phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction. *J Clin Invest* 102:1152-1160.
- Bachofen M, Weibel ER (1982). Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 3(1):35-56
- Baldwin JC, Frist WH, Starkey TD, Harjula A, Starnes VA, Stinson EB, Oyer PE and Shumway NE (1987). Distant graft procurement for combined heart and lung transplantation using pulmonary artery flush and simple topical hypothermia for graft preservation. *Ann Thorac Surg* 43:670-673.

- Bando K, Paradis IL, Komatsu K, Konishi H, Matsushima M, Keena RJ, Hardesty RL, Armitage JM and Griffith BP (1995). Analysis of time-dependent risks for infection, rejection, and death after pulmonary transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 109:49-57; discussion 57-49.
- Bando T, Albes JM, Fehrenbach H, Nusse T, Schafers HJ and Wahlers T (1998). Influence of the potassium concentration on functional and structural preservation of the lung: where is the optimum? *J Heart Lung Transplant* 17:715-724.
- Baretti R, Bitu-Moreno J, Beyersdorf F, Matheis G, Francischetti I and Kreitmayer B (1995). Distribution of lung preservation solutions in parenchyma and airways: influence of atelectasis and route of delivery. *J Heart Lung Transplant* 14:80-91.
- Barr ML, Nishanian GP, Sakamaki Y, Carey JN, Chang J and Starnes VA (1997). A new organ preservation solution, Celsior, is superior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in decreasing lung reperfusion injury. *Transplant Proc* 29:1357-1358.
- Bishop MJ, Giclas PC, Guidotti SM, Su ML and Chi EY (1991). Complement activation is a secondary rather than a causative factor in rabbit pulmonary artery ischemia/reperfusion injury. *Am Rev Respir Dis* 143:386-390.
- Bittner HB, Kendall SW, Chen EP, Craig D and Van Trigt P (1995). The effects of brain death on cardiopulmonary hemodynamics and pulmonary blood flow characteristics. *Chest* 108:1358-1363.
- Boscoe MJ, Goodwin AT, Amrani M and Yacoub MH (2000). Endothelins and the lung. *Int J Biochem Cell Biol* 32:41-62.
- Bysani GK, Kennedy TP, Ky N, Rao NV, Blaze CA and Hoidal JR (1990). Role of cytochrome P-450 in reperfusion injury of the rabbit lung. *J Clin Invest* 86:1434-1441.
- Chien S, Zhang F, Niu W, Tseng MT and Gray L, Jr. (2000). Comparison of university of wisconsin, euro-collins, low-potassium dextran, and krebs-henseleit solutions for hypothermic lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119:921-930.
- Clark SC, Sudarshan CD, Khanna R, Roughan JV, Flecknell PA and Dark JH (1999). A new porcine model of reperfusion injury after lung transplantation. *Lab Anim* 33:135-142.
- Clavien PA, Harvey PR and Strasberg SM (1992). Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 53:957-978.
- Conte JV and Baumgartner WA (2000). Overview and future practice patterns in cardiac and pulmonary preservation. *J Card Surg* 15:91-107.

- Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, Todd TR, Ginsberg RJ, Goldberg M and DeMajo WA (1987). Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* 93:173-181.
- Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER (1982). Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 126(2):332-337
- Date H, Matsumura A, Manchester JK, Cooper JM, Lowry OH and Cooper JD (1993a). Changes in alveolar oxygen and carbon dioxide concentration and oxygen consumption during lung preservation. The maintenance of aerobic metabolism during lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 105:492-501.
- Date H, Matsumura A, Manchester JK, Obo H, Lima O, Cooper JM, Sundaresan S, Lowry OH and Cooper JD (1993b). Evaluation of lung metabolism during successful twenty-four-hour canine lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 105:480-491.
- de Perrot M, Liu M, Waddell TK and Keshavjee S (2003). Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 167:490-511.
- de Perrot M, Sekine Y, Fischer S, Waddell TK, McRae K, Liu M, Wigle DA and Keshavjee S (2002). Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 165:211-215.
- DeCampos KN, Keshavjee S, Liu M and Slutsky AS (1998). Optimal inflation volume for hypothermic preservation of rat lungs. *J Heart Lung Transplant* 17:599-607.
- DeMeester SR, Molinari MA, Shiraishi T, Okabayashi K, Manchester JK, Wick MR, Cooper JD and Patterson GA (1996). Attenuation of rat lung isograft reperfusion injury with a combination of anti-ICAM-1 and anti-beta2 integrin monoclonal antibodies. *Transplantation* 62:1477-1485.
- Derom F (1971). Current state of lung transplantation. *Transplant Proc* 3:313-317.
- Devouassoux G, Pison C, Drouet C, Pin I, Brambilla C and Brambilla E (2001). Early lung leukocyte infiltration, HLA and adhesion molecule expression predict chronic rejection. *Transpl Immunol* 8:229-236.
- Eckenhoff RG, Dodia C, Tan Z and Fisher AB (1992). Oxygen-dependent reperfusion injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol* 72:1454-1460.
- Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF and Ward PA (1997). Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol* 150:1773-1784.
- Eppinger MJ, Jones ML, Deeb GM, Bolling SF and Ward PA (1995). Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. *J Surg Res* 58:713-718.

- Erkasap S and Ates E (2000). L-Arginine-enriched preservation solution decreases ischaemia/reperfusion injury in canine kidneys after long-term cold storage. *Nephrol Dial Transplant* 15:1224-1227.
- Eschwege P, Paradis V, Conti M, Holstege A, Richet F, Deteve J, Menager P, Legrand A, Jardin A, Bedossa P and Benoit G (1999). In situ detection of lipid peroxidation by-products as markers of renal ischemia injuries in rat kidneys. *J Urol* 162:553-557.
- Fehrenbach A, Wittwer T, Cornelius J, Ochs M, Fehrenbach H, Wahlers T and Richter J (1999). Improvement of rat lung structure and function after preservation with celsior. *J Surg Res* 82:285-293.
- Fehrenbach A, Ochs M, Warnecke T, Wahlers T, Wittwer T, Schmiedl A, Elki S, Meyer D, Richter J and Fehrenbach H (2000). Beneficial effect of lung preservation is related to ultrastructural integrity of tubular myelin after experimental ischemia and reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* 161:2058-2065.
- FELASA (1998). Recommendations for the health monitoring of breeding colonies and experimental units of cat, dog and pig. *Laboratory Animals* 32, 1-17
- Fischer S, Hopkinson D, Liu M, MacLean AA, Edwards V, Cutz E and Keshavjee S (2001). Raffinose improves 24-hour lung preservation in low potassium dextran glucose solution: a histologic and ultrastructural analysis. *Ann Thorac Surg* 71:1140-1145.
- Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE, Kern JA and Kron IL (2001). Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121:1069-1075.
- Fisher AB and Dodia C (1981). Lung as a model for evaluation of critical intracellular PO<sub>2</sub> and PCO. *Am J Physiol* 241:E47-50.
- Fisher AB, Dodia C, Tan ZT, Ayene I and Eckenhoff RG (1991). Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia. *J Clin Invest* 88:674-679.
- Fisher AJ, Donnelly SC, Hirani N, Haslett C, Strieter RM, Dark JH and Corris PA (2001). Elevated levels of interleukin-8 in donor lungs is associated with early graft failure after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 163:259-265.
- Frank MM (1987). Complement in the pathophysiology of human disease. *N Engl J Med* 316:1525-1530.
- Fujimura S, Handa M, Kondo T, Ichinose T, Shiraishi Y and Nakada T (1987). Successful 48-hour simple hypothermic preservation of canine lung transplants. *Transplant Proc* 19:1334-1336.

- Fukuse T, Hirata T, Nakamura T, Kawashima M, Hitomi S and Wada H (1999). Influence of deflated and anaerobic conditions during cold storage on rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 160:621-627.
- Fukuse T, Albes JM, Wilhelm A, Bando T, Fischer F, Hausen B, Rohde R, Wahlers T and Schafers HJ (1996). Influence of dextrans on lung preservation: is the molecular weight important? *J Heart Lung Transplant* 15:903-910.
- Gehr P, Bachofen M, Weibel ER (1978). The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffuse capacity. *Respir Physiol* 32(2):121-140
- Gerlach J, Jorres A, Nohr R, Zeilinger K, Spatkowski G and Neuhaus P (1999). Local liberation of cytokines during liver preservation. *Transpl Int* 12:261-265.
- Gorler A and Haverich A (2000). Adequate lung preservation for clinical lung transplantation: an important condition for satisfactory graft function. *J Card Surg* 15:141-148.
- Greco R, Benito J, Gonzalez M, De Miguel E and Vazquez J (1999). Lung transplantation from ventilated non-heart-beating donors: experimental study in a neonatal swine model. *J Pediatr Surg* 34:360-366.
- Grover FL, Fullerton DA, Zamora MR, Mills C, Ackerman B, Badesch D, Brown JM, Campbell DN, Chetham P, Dhaliwal A, Diercks M, Kinnard T, Niejadlik K and Ochs M (1997). The past, present, and future of lung transplantation. *Am J Surg* 173:523-533.
- Haniuda M, Hasegawa S, Shiraishi T, Dresler CM, Cooper JD and Patterson GA (1996). Effects of inflation volume during lung preservation on pulmonary capillary permeability. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112:85-93.
- Hardy JD (1999). The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc* 31:25-29.
- Harringer W and Haverich A (2002). Heart and heart-lung transplantation: standards and improvements. *World J Surg* 26:218-225.
- Hausen B, Beuke M, Schroeder F, Poets CF, Hewitt C, DelRossi AJ and Schafers HJ (1997). In vivo measurement of lung preservation solution efficacy: comparison of LPD, UW, EC and low K<sup>+</sup>-EC following short and extended ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg* 12:771-779; discussion 779-780.
- Haverich A, Scott WC and Jamieson SW (1985). Twenty years of lung preservation--a review. *J Heart Transplant* 4:234-240.
- Haverich A, Aziz S, Scott WC, Jamieson SW and Shumway NE (1986). Improved lung preservation using Euro-Collins solution for flush-perfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 34:368-376.

- Haverich A, Dammenhayn L, Demertzis S, Kemnitz J and Reimers P (1991). Lung growth after experimental pulmonary transplantation. *J Heart Lung Transplant* 10:288-295.
- Henderson LM, Chappell JB and Jones OT (1988). Superoxide generation by the electrogenic NADPH oxidase of human neutrophils is limited by the movement of a compensating charge. *Biochem J* 255:285-290.
- Hertz MI, Taylor DO, Trulock EP, Boucek MM, Mohacsi PJ, Edwards LB and Keck BM (2002). The registry of the international society for heart and lung transplantation: nineteenth official report-2002. *J Heart Lung Transplant* 21:950-970.
- Hiramatsu Y, Muraoka R, Chiba Y and Sasaki M (1994). Influence of pH of preservation solution on lung viability. *Ann Thorac Surg* 58:1083-1086.
- Hogg JC (1987). Neutrophil kinetics and lung injury. *Physiol Rev* 67:1249-1295.
- Hohlfeld JM, Struber M, Ahlf K, Hoeper MM, Fraund S, Krug N, Warnecke G, Harringer W, Haverich A and Fabel H (1999). Exogenous surfactant improves survival and surfactant function in ischaemia-reperfusion injury in minipigs. *Eur Respir J* 13:1037-1043.
- Hopkinson DN, Bhabra MS and Hooper TL (1998). Pulmonary graft preservation: a worldwide survey of current clinical practice. *J Heart Lung Transplant* 17:525-531.
- Hopkinson DN, Odom NJ, Bridgewater BJ and Hooper TI (1996). Comparison of saccharides as osmotic impermeants during hypothermic lung graft preservation. *Transplantation* 61:1667-1671.
- Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM and Novick RJ (2000). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official report-2000. *J Heart Lung Transplant* 19:909-931.
- Huang YT, Ghio AJ, Nozik-Grayck E and Piantadosi CA (2001). Vascular release of nonheme iron in perfused rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L474-481.
- Huddleston CB and Mendeloff EN (2000). Heart and lung preservation for transplantation. *J Card Surg* 15:108-121.
- Hughes HC (1986) Swine in cardiovascular research. *Lab Anim Sci* 36:348-350.
- Ingemansson R, Massa G, Pandita RK, Sjoberg T and Steen S (1995). Perfadex is superior to Euro-Collins solution regarding 24-hour preservation of vascular function. *Ann Thorac Surg* 60:1210-1214.
- Izbicki G, Shitrit D, Aravot D, Sulkes J, Saute M, Sahar G, Kramer MR (2002).

Improved survival after lung transplantation in patients treated with tacrolimus/mycophenolate mofetil as compared with cyclosporine/azathioprine. *Transplant Proc* 34:3258-3259

Jones MT, Hsieh C, Yoshikawa K, Patterson GA and Cooper JD (1988). A new model for assessment of lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 96:608-614.

Kapelanski DP, Iguchi A, Niles SD and Mao HZ (1993). Lung reperfusion injury is reduced by inhibiting a CD18-dependent mechanism. *J Heart Lung Transplant* 12:294-306; discussion 306-297.

Kayano K, Toda K, Naka Y and Pinsky DJ (1999a). Identification of optimal conditions for lung graft storage with Euro-Collins solution by use of a rat orthotopic lung transplant model. *Circulation* 100:II257-261.

Kayano K, Toda K, Naka Y, Okada K, Oz MC and Pinsky DJ (1999b). Superior protection in orthotopic rat lung transplantation with cyclic adenosine monophosphate and nitroglycerin-containing preservation solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 118:135-144.

Kelly RF (2000). Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med* 136:427-440.

Keshavjee SH, Yamazaki F, Cardoso PF, McRitchie DI, Patterson GA and Cooper JD (1989). A method for safe twelve-hour pulmonary preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 98:529-534.

Keshavjee SH, Yamazaki F, Yokomise H, Cardoso PF, Mullen JB, Slutsky AS and Patterson GA (1992). The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103:314-325.

Kimblad PO, Sjoberg T, Massa G, Solem JO and Steen S (1991). High potassium contents in organ preservation solutions cause strong pulmonary vasocontraction. *Ann Thorac Surg* 52:523-528.

King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, Tribble CG and Kron IL (2000). Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg* 69:1681-1685.

Kirk AJ, Colquhoun IW and Dark JH (1993). Lung preservation: a review of current practice and future directions. *Ann Thorac Surg* 56:990-100.

Kitagawa S and Johnston RB, Jr. (1985). Relationship between membrane potential changes and superoxide-releasing capacity in resident and activated mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 135:3417-3423.

Kur F, Reichenspurner H, Meiser BM, Welz A, Furst H, Muller C, Vogelmeier C,



- Schwaiblmaier M, Briegel J and Reichart B (1999). Tacrolimus (FK506) as primary immunosuppressant after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 47:174-178
- Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, Ziai F, Zandi-Nejad K, Mackenzie HS, Hancock WW and Tilney NL (2000). Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death. *Transplantation* 69:405-410.
- Lansman JB (1988). Endothelial mechanosensors. Going with the flow. *Nature* 331:481-482.
- Lemay S, Rabb H, Postler G and Singh AK (2000). Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 69:959-963.
- Love RB, Conhaim RL and Harms BA (1996). Effects of University of Wisconsin and Euro-Collins solutions on interstitial pulmonary edema in isolated rat lungs. *Transplantation* 61:1014-1018.
- Lu YT, Hellewell PG and Evans TW (1997). Ischemia-reperfusion lung injury: contribution of ischemia, neutrophils, and hydrostatic pressure. *Am J Physiol* 273:L46-54.
- Mangino JE, Kotadia B and Mangino MJ (1996). Characterization of hypothermic intestinal ischemia-reperfusion injury in dogs. Effects of glycine. *Transplantation* 62:173-178.
- Mayer E, Puskas JD, Cardoso PF, Shi S, Slutsky AS and Patterson GA (1992). Reliable eighteen-hour lung preservation at 4 degrees and 10 degrees C by pulmonary artery flush after high-dose prostaglandin E1 administration. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103:1136-1142.
- McCord JM (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159-163.
- McLaughlin VV and Rich S (1998). Pulmonary hypertension--advances in medical and surgical interventions. *J Heart Lung Transplant* 17:739-743.
- Menasche P, Termignon JL, Pradier F, Grousset C, Mouas C, Alberici G, Weiss M, Piwnica A and Bloch G (1994). Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur J Cardiothorac Surg* 8:207-213.
- Mertes PM, el Abassi K, Jaboin Y, Burtin P, Pinelli G, Carteaux JP, Burlet C, Boulange M and Villemot JP (1994). Changes in hemodynamic and metabolic parameters following induced brain death in the pig. *Transplantation* 58:414-418.
- Meyers BF and Patterson GA (1999). Lung transplantation: current status and future prospects. *World J Surg* 23:1156-1162.

- Minamiya Y, Tozawa K, Kitamura M, Saito S and Ogawa J (1998). Platelet-activating factor mediates intercellular adhesion molecule-1-dependent radical production in the nonhypoxic ischemia rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:150-157.
- Miotla JM, Jeffery PK and Hellewell PG (1998). Platelet-activating factor plays a pivotal role in the induction of experimental lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:197-204.
- Mizutani H, Minamoto K, Aoe M, Yamashita M, Date H, Andou A and Shimizu N (1998). Expression of endothelin-1 and effects of an endothelin receptor antagonist, TAK-044, at reperfusion after cold preservation in a canine lung transplantation model. *J Heart Lung Transplant* 17:835-845.
- Moore TM, Khimenko P, Adkins WK, Miyasaka M and Taylor AE (1995). Adhesion molecules contribute to ischemia and reperfusion-induced injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol* 78:2245-2252.
- Müller C, Furst H, Reichenspurner H, Briegel J, Groh J and Reichart B (1999). Lung procurement by low-potassium dextran and the effect on preservation injury. Munich Lung Transplant Group. *Transplantation* 68:1139-1143.
- Müller C, Bittmann I, Hatz R, Kellner B, Schelling G, Furst H, Reichart B and Schildberg FW (2002). Improvement of lung preservation -- from experiment to clinical practice. *Eur Surg Res* 34:77-82.
- Nagase T, Ishii S, Kume K, Uozumi N, Izumi T, Ouchi Y and Shimizu T (1999). Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. *J Clin Invest* 104:1071-1076.
- Naidu BV, Krishnadasan B, Byrne K, Farr AL, Rosengart M, Verrier ED and Mulligan MS (2002). Regulation of chemokine expression by cyclosporine A in alveolar macrophages exposed to hypoxia and reoxygenation. *Ann Thorac Surg* 74:899-905; discussion 905.
- Naka Y, Toda K, Kayano K, Oz MC and Pinsky DJ (1997a). Failure to express the P-selectin gene or P-selectin blockade confers early pulmonary protection after lung ischemia or transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:757-761.
- Naka Y, Marsh HC, Scesney SM, Oz MC and Pinsky DJ (1997b). Complement activation as a cause for primary graft failure in an isogeneic rat model of hypothermic lung preservation and transplantation. *Transplantation* 64:1248-1255.
- Novick RJ, Menkis AH and McKenzie FN (1992). New trends in lung preservation: a collective review. *J Heart Lung Transplant* 11:377-392.
- Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J and Stern D (1990). Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *J Clin Invest* 85:1090-1098.

- Ono K, Sone Y, Irie T, Ohnuki T and Nitta S (1998). Does potassium ion concentration affect lung preservation? *Surg Today* 28:192-196.
- Oz MC, Liao H, Naka Y, Seldomridge A, Becker DN, Michler RE, Smith CR, Rose EA, Stern DM and Pinsky DJ (1995). Ischemia-induced interleukin-8 release after human heart transplantation. A potential role for endothelial cells. *Circulation* 92:11428-432.
- Pegg DE (1986). Organ preservation. *Surg Clin North Am* 66:617-632.
- Reignier J, Mazmanian M, Chapelier A, Alberici G, Menasche P, Weiss M and Herve P (1995). Evaluation of a new preservation solution: Celsior in the isolated rat lung. Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *J Heart Lung Transplant* 14:601-604.
- Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, Sakamaki Y, Starnes VA and Barr ML (1999). A comparison of the new preservation solution Celsior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation* 67:152-155.
- Sakamaki F, Hoffmann H, Muller C, Dienemann H, Messmer K and Schildberg FW (1997). Reduced lipid peroxidation and ischemia-reperfusion injury after lung transplantation using low-potassium dextran solution for lung preservation. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1073-1081.
- Sakamaki F, Hoffmann H, Munzing S, Krombach F, Messmer K and Schildberg FW (1999). Effects of lung preservation solutions on PMN activation in vitro. *Transpl Int* 12:113-121.
- Sakuma T, Tsukano C, Ishigaki M, Nambu Y, Osanai K, Toga H, Takahashi K, Ohya N, Kurihara T, Nishio M and Matthay MA (2000). Lung deflation impairs alveolar epithelial fluid transport in ischemic rabbit and rat lungs. *Transplantation* 69:1785-1793.
- Salvatierra A, Velasco F, Rodriguez M, Alvarez A, Lopez-Pedreria R, Ramirez R, Carracedo J, Lopez-Rubio F, Lopez-Pujol A and Guerrero R (1997). C1-esterase inhibitor prevents early pulmonary dysfunction after lung transplantation in the dog. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1147-1154.
- Sasaki M, Muraoka R, Chiba Y and Hiramatsu Y (1996). Influence of pulmonary arterial pressure during flushing on lung preservation. *Transplantation* 61:22-27.
- Sasaki S, McCully JD, Alessandrini F and LoCicero J, 3rd (1995). Impact of initial flush potassium concentration on the adequacy of lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 109:1090-1095; discussion 1095-1096.
- Sato Y, Hogg JC, English D and van Eeden SF (2000). Endothelin-1 changes polymorphonuclear leukocytes' deformability and CD11b expression and promotes their retention in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:404-410.

- Schneuwly OD, Licker M, Pastor CM, Schweizer A, Slosman DO, Kapanci Y, Nicod LP, Robert J, Spiliopoulos A and Morel DR (1999). Beneficial effects of leukocyte-depleted blood and low-potassium dextran solutions on microvascular permeability in preserved porcine lung. *Am J Respir Crit Care Med* 160:689-697.
- Scholz RW, Woodward BM and Rhoades RA (1972). Utilization in vitro and in vivo of glucose and glycerol by rat lung. *Am J Physiol* 223:991-996.
- Semik M, Konertz W, Moller F and Bernhard A (1987). Successful 24-hour preservation of the lung--evaluation of viability in a rat model. *Transplant Proc* 19:4171-4172.
- Serrick C, Adoumie R, Giaid A and Shennib H (1994). The early release of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma after ischemia reperfusion injury in the lung allograft. *Transplantation* 58:1158-1162.
- Shennib H, Serrick C, Saleh D, Reis A, Stewart DJ and Giaid A (1995). Plasma endothelin-1 levels in human lung transplant recipients. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3:S516-518.
- Shiraishi T, Igisu H and Shirakusa T (1994). Effects of pH and temperature on lung preservation: a study with an isolated rat lung reperfusion model. *Ann Thorac Surg* 57:639-643.
- Sommers KE, Griffith BP, Hardesty RL and Keenan RJ (1996). Early lung allograft function in twin recipients from the same donor: risk factor analysis. *Ann Thorac Surg* 62:784-790.
- Spaggiari L and Bobbio P (1994). Dextran 40 at 2% versus 5% in low-potassium solutions: which is best? *Ann Thorac Surg* 58:1784-1786.
- Speich R, Boehler A, Zalunardo MP, Stocker R, Russi EW and Weder W (2001). Improved results after lung transplantation--analysis of factors. *Swiss Med Wkly* 131:238-245.
- Stammberger U, Carboni GL, Hillinger S, Schneiter D, Weder W and Schmid RA (1999). Combined treatment with endothelin- and PAF-antagonists reduces posttransplant lung ischemia/reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 18:862-868.
- Steen S, Sjoberg T, Ingemansson R and Lindberg L (1994a). Efficacy of topical cooling in lung preservation: is a reappraisal due? *Ann Thorac Surg* 58:1657-1663.
- Steen S, Sjoberg T, Massa G, Ericsson L and Lindberg L (1993). Safe pulmonary preservation for 12 hours with low-potassium-dextran solution. *Ann Thorac Surg* 55:434-440.

- Steen S, Kimblad PO, Sjöberg T, Lindberg L, Ingemansson R and Massa G (1994b). Safe lung preservation for twenty-four hours with Perfadex. *Ann Thorac Surg* 57:450-457.
- Steen S, Sjöberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L and Algotsson L (2001). Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet* 357:825-829.
- Steinhoff G, Behrend M, Richter N, Schlitt HJ, Cremer J and Haverich A (1995). Distinct expression of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules on endothelial cells in human heart and lung transplants. *J Heart Lung Transplant* 14:1145-1155.
- Stewart KC and Patterson GA (2001). Current trends in lung transplantation. *Am J Transplant* 1:204-210.
- Strüber M, Hohlfeld JM, Fraund S, Kim P, Warnecke G and Haverich A (2000). Low-potassium dextran solution ameliorates reperfusion injury of the lung and protects surfactant function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120:566-572.
- Strüber M, Wilhelmi M, Harringer W, Niedermeyer J, Anssar M, Kunsebeck A, Schmitto JD and Haverich A (2001). Flush perfusion with low potassium dextran solution improves early graft function in clinical lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 19:190-194.
- Sugita M, Suzuki S, Kondo T, Noda M and Fujimura S (1999). Transalveolar fluid absorption ability in rat lungs preserved with Euro-Collins solution and EP4 solution. *Transplantation* 67:349-354.
- Sundaresan S, Mohanakumar T, Smith MA, Trulock EP, Lynch J, Phelan D, Cooper JD and Patterson GA (1998). HLA-A locus mismatches and development of antibodies to HLA after lung transplantation correlate with the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 65:648-653.
- Sundaresan S, Lima O, Date H, Matsumura A, Tsuji H, Obo H, Aoe M, Mizuta T and Cooper JD (1993). Lung preservation with low-potassium dextran flush in a primate bilateral transplant model. *Ann Thorac Surg* 56:1129-1135.
- Suzuki S, Inoue K, Sugita M, Tsubochi H, Kondo T and Fujimura S (2000). Effects of EP4 solution and LPD solution vs Euro-Collins solution on Na(+)/K(+)-ATPase activity in rat alveolar type II cells and human alveolar epithelial cell line A549 cells. *J Heart Lung Transplant* 19:887-893.
- Tanaka H, Chiba Y, Sasaki M, Matsukawa S and Muraoka R (1998). Relationship between flushing pressure and nitric oxide production in preserved lungs. *Transplantation* 65:460-464.
- Toronto Transplant Group (1986). Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. Toronto Lung Transplant Group. *N Engl J Med* 314:1140-1145.
- Uhlig S and Wollin L (1994). An improved setup for the isolated perfused rat lung. *J Pharmacol Toxicol Methods* 31:85-94.

- Universität Heidelberg, Institut für Anatomie und Zellbiologie (1999) Elektronenmikroskopischer Atlas im Internet.
- Wang LS, Yoshikawa K, Miyoshi S, Nakamoto K, Hsieh CM, Yamazaki F, Guerreiro Cardoso PF, Schaeffers HJ, Brito J, Keshavjee SH and et al. (1989). The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple ex vivo rabbit model used for functional assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 98:333-342.
- Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE and Matthay MA (1999). Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 159:980-988.
- Weber KC and Visscher MB (1969). Metabolism of the isolated canine lung. *Am J Physiol* 217:1044-1052.
- Weder W, Harper B, Shimokawa S, Miyoshi S, Date H, Schreinemakers H, Egan T and Cooper JD (1991). Influence of intraalveolar oxygen concentration on lung preservation in a rabbit model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 101:1037-1043.
- Wittwer T, Wahlers T, Fehrenbach A, Elki S and Haverich A (1999a). Improvement of pulmonary preservation with Celsior and Perfadex: impact of storage time on early post-ischemic lung function. *J Heart Lung Transplant* 18:1198-1201.
- Wittwer T, Wahlers T, Cornelius JF, Elki S and Haverich A (1999b). Celsior solution for improvement of currently used clinical standards of lung preservation in an ex vivo rat model. *Eur J Cardiothorac Surg* 15:667-671.
- Wittwer T, Fehrenbach A, Meyer D, Brandes H, Albes J, Richter J and Wahlers T (2000). Retrograde flush perfusion with low-potassium solutions for improvement of experimental pulmonary preservation. *J Heart Lung Transplant* 19:976-983.
- Wittwer T, Wahlers T, Fehrenbach A, Cornelius JF, Elki S, Ochs M, Fehrenbach H, Albes J, Haverich A and Richter J (1999c). Combined use of prostacyclin and higher perfusate temperatures further enhances the superior lung preservation by Celsior solution in the isolated rat lung. *J Heart Lung Transplant* 18:684-692.
- Xiong L, Legagneux J, Wassef M, Oubenaissa A, Detruit H, Mouas C and Menasche P (1999). Protective effects of Celsior in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 18:320-327.
- Yacoub MH, Khaghani A, Banner N, Tajkarimi S and Fitzgerald M (1989). Distant organ procurement for heart and lung transplantation. *Transplant Proc* 21:2548-2550.
- Yagi,K (1982). Lipid peroxides in biology and medicine. *Academic Press New York* 1982

- Yamashita M, Schmid RA, Ando K, Cooper JD and Patterson GA (1996). Nitroprusside ameliorates lung allograft reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 62:791-796; discussion 796-797.
- Yamazaki F, Yokomise H, Keshavjee SH, Miyoshi S, Cardoso PF, Slutsky AS and Patterson GA (1990). The superiority of an extracellular fluid solution over Euro-Collins' solution for pulmonary preservation. *Transplantation* 49:690-694.
- Zhao G, Ayene IS and Fisher AB (1997a). Role of iron in ischemia-reperfusion oxidative injury of rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:293-299.
- Zhao G, al-Mehdi AB and Fisher AB (1997b). Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am J Physiol* 273:L1112-1117.
- Zimmerman BJ and Granger DN (1994). Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci* 307:284-292.

## 7. Verzeichnisse

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Lungenalveole	S.16
Abbildung 2:	Lungenblock Spendertier	S. 39
Abbildung 3:	Empfängersitus	S. 40
Abbildung 4:	Flushdruck	S. 48
Abbildung 5:	Flushzeit	S. 49
Abbildung 6:	Kumulatives Überleben	S. 51
Abbildung 7:	Pulmonalvaskulärer Widerstand im zeitlichen Verlauf	S. 52
Abbildung 8:	Pulmonalvaskulärer Widerstand-Mittelwert	S. 52
Abbildung 9:	Dynamische Compliance im zeitlichen Verlauf	S. 54
Abbildung 10:	Dynamische Compliance-Mittelwert	S. 54
Abbildung 11:	Oxygenierungsindex $[p_aO_2/F_iO_2]$ im zeitlichen Verlauf	S. 56
Abbildung 12:	Oxygenierungsindex $[p_aO_2/F_iO_2]$ -Mittelwert	S. 56
Abbildung 13:	Wet/Dry-Ratio	S. 58
Abbildung 14:	PMN/Alveolus	S. 59
Abbildung 15:	Malondialdehyd im zeitlichen Verlauf	S. 60
Abbildung 16:	Malondialdehyd-Mittelwert	S. 60
Abbildung 17:	Endothelin-1 im zeitlichen Verlauf	S. 62
Abbildung 18:	Endothelin-1-Mittelwert	S. 62



## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung aktueller Konservierungslösungen	S. 25
Tabelle 2:	Körpergewichte Spender- und Empfängertiere	S. 46
Tabelle 3:	HZV der Spendertiere	S. 47
Tabelle 4:	Pulmonalvaskulärer Widerstand der Spendertiere	S. 47
Tabelle 5:	MAP der Spendertiere	S. 47
Tabelle 6:	$p_aO_2$ der Spendertiere	S. 48
Tabelle 7:	Flushdruck	S. 48
Tabelle 8:	Flushzeit	S. 49
Tabelle 9:	Kalte Ischämiezeit und Transplantationszeit	S. 50
Tabelle 10:	Pulmonalvaskulärer Widerstand	S. 53
Tabelle 11:	Dynamische Compliance	S. 55
Tabelle 12:	Oxygenierungsindex $[p_aO_2/F_iO_2]$	S. 57
Tabelle 13:	Wet/Dry-Ratio	S. 58
Tabelle 14:	PMN/Alveolus	S. 59
Tabelle 15:	Malondialdehyd	S. 61
Tabelle 16:	Endothelin-1	S. 63

## **8. Anhang**

### **8.1 Lebenslauf**

#### **Persönliche Daten**

Felix Pfeifer, geboren am 18.02.1977 in Karlsruhe

#### **Schulbildung**

1983 – 1987	Pestalozzi Grundschule, Stutensee
1987 – 1996	Thomas-Mann-Gymnasium, Stutensee
06/1996	Allgemeine Hochschulreife

#### **Hochschulstudium**

10/1996 – 10/2003	Studium der Medizin, Friedrich-Schiller Universität, Jena
09/1999 – 01/2000	Studium der Medizin, University of Oulu, Finnland
10/2003	Hochschulabschluss

#### **Beruf**

12/2003 – 10/2004	Arzt im Praktikum, Universitätsklinikum Leipzig, Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie
seit 10/2004	Arzt in Weiterbildung, Universitätsklinikum Leipzig, Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie

Leipzig, den 11.03.2005

## **8.2 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Wahlers und PD Dr. med. habil. Wittwer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Leipzig, den 11.03.2005

### **8.3 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Wahlers danken, der mir ermöglicht hat, meine wissenschaftliche Arbeit in seiner Klinik durchführen zu können. Besonders herzlich bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. habil. Wittwer für seinen unermüdlichen Einsatz in der Planung und Durchführung der tierexperimentellen Versuche. Durch seine engagierte Betreuung, während der experimentellen Phase und bei der Abfassung des Manuskripts, war er maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt.

Für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente danke ich dem Team des herzchirurgischen Labors im tierexperimentellen Institut der Universität Jena unter Leitung von Frau Sigrun Kirste mit ihren Mitarbeiterinnen Frau Simone Böhm und Frau Katrin Hornung. Herrn Dr. Schubert, Leiter des tierexperimentellen Institutes sowie seinen Mitarbeitern danke ich für die tatkräftige Unterstützung und nette Zusammenarbeit während der gesamten experimentellen Phase.

Herrn Dr. Volland des Institutes für Medizinische Statistik der Universität Jena danke ich für die konstruktive Beratung in allen statistischen Fragen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für die große Unterstützung während dieser Arbeit sowie des gesamten Studiums.